

CDNF:n vaikutukset amyotrofisen lateraaliskleroosin TDP-43-
rottamallisissa

Thomas Tallberg
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja
lääkehoidon osasto

Lokakuu 2017



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Osasto/Sektion – Department Farmakologian ja lääkehoidon osasto
Tekijä/Författare – Author Thomas Tallberg		
Työn nimi / Arbetets titel – Title CDNF:n vaikutukset amyotrofisen lateraaliskleroosin TDP-43-rottamallissa		
Oppiaine / Läroämne – Subject Farmakologia		
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika/Datum – Month and year Lokakuu 2017	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 75 + 1 liite
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Transaktiivisen vasteen DNA:ta sitova proteiini 43 (TDP-43) on RNA:ta sitova proteiini, joka osallistuu transkriptionaalisella tasolla geenien ilmentymiseen. TDP-43 lokalisoituu solujen tumaan. Hermorappeumasairauksiin kuuluva amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) johtaa ylempien ja alemmien liikehermosolujen tuhoon. Suurimalla osalla ALS-potilaista esiintyy TDP-43:n lokalisoitumista hermosolujen ja glia-solujen solulimaan. TDP-43-rotan ALS-eläinmallin avulla voidaan tutkia ALS:n kaltaista sairautta ja molekulaarisia mekanismeja. Tämä eläinmalli on aikaisemmin karakterisoitu kirjallisuudessa. Serebraalinen dopamiinisolujen hermokasvutekijä (CDNF) on neuroprotektiivinen ja neurorestoratiivinen hermokasvutekijä rotan Parkinsonin taudin eläinmallissa. CDNF:llä voi mahdollisesti vaikuttaa ALS-sairauden kulkuun.</p> <p>Yhtenä tavoitteena tässä lopputyössä on uudelleen karakterisoida TDP-43-rotan ALS-eläinmalli ja toistaa aikaisemmin julkaistut tulokset. Toinen tavoite on hoitaa TDP-43-rottia infusoimalla CDNF:ää kroonisesti aivokammioon, ja verrata oireiden esiintymistä TDP-43-rottiin jotka saavat fosfaatilla puskuroitua saliinia. Käyttäytymiskokeita tehdään kolme kertaa viikossa ja kun rotat saavuttavat päätepisteen, selkäytimet poistetaan. Liikehermosolujen laskentaa ja stressijyvien esiintymistä selkäydinleikkeissä tutkitaan immunohistokemian avulla. Kroonisesti aivokammioon annosteltavan CDNF:n diffuusiota aivoissa tutkitaan myös rotilla immunohistokemian avulla.</p> <p>TDP-43-rottien karakterisointiosuudessa pystyttiin toistamaan osittain aikaisemmin julkaistut tulokset. TDP-43-rottien oireiden esiintymistä ei voitu estää tai hidastaa CDNF:llä. Liikehermosolujen määrä TDP-43-rottien selkäytimessä oli radikaalisti vähentynyt molemmissa koeryhmissä. Stressijyviä ei havaittu TDP-43-rottien selkäytimessä. CDNF:n diffundoituminen oli hyvin rajallista rottien aivoissa. Suurempien annosten antaminen ja mahdollisesti muuttamalla kanyylin syvyyttä tai annostelureittiä voisi harkita tulevissa kokeissa.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords ALS, TDP-43, TDP-43-patologia, TDP-43-eläinmallit, CDNF		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto		
Muuta tietoa – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaaja: Merja Voutilainen (FT)		



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Pharmacy		Osasto/Sektion – Department Division of Pharmacology and Pharmacotherapy	
Tekijä/Författare – Author Thomas Tallberg			
Työn nimi / Arbetets titel – Title The effects of CDNF in TDP-43 rat amyotrophic lateral sclerosis model			
Oppiaine /Läroämne – Subject Pharmacology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis		Aika/Datum – Month and year October 2017	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 75 + 1 appendix
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Transactive DNA Response Element Binding Protein 43 (TDP-43) is a RNA binding protein participating in gene expression on a transcriptional level. It is localized in the cell nucleus. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease affecting upper and lower motor neurons. In most ALS patients TDP-43 becomes localized into the cytoplasm of neurons and glia cells. The TDP-43 rat ALS model provide insight in ALS disease progression and molecular mechanisms. This animal model has been characterized previously in the literature. Cerebral Dopamine Growth Factor (CDNF) is a neuroprotective and restorative protein in rat animal model of Parkinson's disease. CDNF may have an impact on disease progression in ALS.</p> <p>One of the goals in this work was to recharacterize the TDP-43 rat ALS model and to try repeat published data. The other aim of this work was to treat TDP-43 rats with intraventricular chronic infusion of CDNF, and to compare symptom progression with TDP-43 rats treated with phosphate buffered saline. Behavioral assays were done trice a week and when rats reached endpoint, spinal cords were removed. Motor neuron counting and detection of stress granule formation were investigated in spinal cords with immunohistochemistry. Also, the volume of CDNF diffusion in rat brain after chronic intraventricular CDNF infusion was investigated with immunohistochemistry.</p> <p>In the characterization part, symptom progression was repeated in a similar manner as it has been reported previously. CDNF treatment could not stop the symptom progression nor slow down the progression of symptoms in TDP-43 rats. Motor neuron counting revealed a heavy loss of motor neurons in the lumbar part of the spinal cord in both treatment groups. Diffusion of CDNF was very poor in the rat brain. Higher doses of CDNF and proper administration depth in the brain or route of administration should be reconsidered in the future.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords ALS, TDP-43, TDP-43 pathology, TDP-43 rodent models, CDNF			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Faculty of Pharmacy, University of Helsinki			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisor: Merja Voutilainen (PhD (Pharm))			

Lyhenteet

<i>ADARB2</i>	Adenosiinia inosiiniksi editoiva entsyymi B2 -geeni (engl. Adenosine deaminase RNA specific B2 gene)
ADARB2	Adenosiinia inosiiniksi editoiva entsyymi B2 (engl. Adenosine deaminase RNA specific B2)
ANOVA	Varianssianalyysi (engl. Analysis of variance)
AMPA	Alfa-amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-isoksatsolipropionihappo
Ala	Alaniini (engl. Alanine)
ALS	Amyotrofinen lateraaliskleroosi
Asn	Asparagiini (engl. Asparagine)
Asp	Aspartaatti (engl. Aspartate)
<i>Atf4</i>	Aktivoiva transkriptiotekijä 4 -geeni (engl. Activating transcription factor 4)
ATF4	Aktivoiva transkriptiotekijä 4 (engl. Activating transcription factor 4)
ATF6	Aktivoiva transkriptiotekijä 6 (engl. Activating transcription factor 6)
<i>BiP</i>	Immunoglobuliinin raskaan ketjun tunnistava proteiini -geeni (engl. Immunoglobulin heavy chain binding protein gene)
BiP	Immunoglobuliinin raskaan ketjun tunnistava proteiini (engl. Immunoglobulin heavy chain binding protein)
DNA	Deoksiribonukleiinihappo (engl. Deoxyribonucleic acid)
<i>Camk2a</i>	Kalsium-kalmoduliinikinaasi 2 a -geeni (<i>Camk2a</i> : engl. Calcium calmodulin dependent kinase 2 a gene)
cDNA	Komplementaarinen DNA (engl. Complementary DNA)
CHOP	C/EBP samasyntyinen proteiini (engl. C/EBP homologous protein)
CDNF	Serebraaliinen dopaminsolujen hermokasvutekijä (engl. Cerebral dopaminergic neural growth factor)
C-CDNF	Serebraalisen dopamiinisolujen hermokasvutekijän -fragmentti josta puuttuu amino-terminaalinen osa
C°	Celsiusaste

<i>ChAT</i>	Hiiren koliiniasetyylitransferaasi -geeni (engl. Choline acetyl transferase gene)
ChAT	Hiiren koliiniasetyylitransferaasi (engl. Choline acetyl transferase)
eIF2 α	Eukaryoottinen initiaatiotekijä-2 alfa (engl. Eukaryotic initiator factor 2 α)
fALS	Perinnöllinen amyotrofinen lateraaliskleroosi (familial ALS)
FTLD	Otsa- ja ohimolohkorappeumasta johtuva dementia (engl. Frontotemporal lobar dementia)
FTLD-U	Otsa- ja ohimolohkorappeumasta johtuva dementia jossa esiintyy ubikitoituneita proteiini aggregaatteja
G	Guaaniini (engl. Guanine)
<i>Gfap</i>	Gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini -geeni (engl. Glial fibrillary acidic protein)
Gln	Glutamiini (engl. Glutamine)
<i>GluR2</i>	Glutamaatti-reseptorin alayksikkö R2 -geeni (engl. Glutamate receptor subunit 2 gene)
GluR2	Glutamaatti-reseptorin alayksikkö R2 (engl. Glutamate receptor subunit 2)
iPSC	Indusoitu pluripotentti kantasolu (engl. Induced pluripotent stem cell)
IRE1	Inositolia tarvitseva entsyymi 1 (engl. Inositol requiring enzyme 1)
kDa	Kilodaltoni (engl. Kilodalton)
Met	Metioniini (engl. Methionine)
mm	Millimetriä
MMP-9	Matriksia pilkkova metalloproteaasi 9 (engl. Matrix metalloproteinase 9)
<i>NEFL</i>	Humaanin kevyen neurofilamentin -geeni (engl: Human neurofilament light chain gene)
<i>Nefl</i>	Hiiren kevyen neurofilamentin -geeni (engl: Mouse neurofilament light chain gene)
NES	Aminohapposekvenssi jonka avulla kulkeutuu tumasta ulos (engl. Nuclear export signal)
NLS	Aminohapposekvenssi jonka avulla kulkeutuu tumaan (engl. Nuclear

	localisation signal)
PERK	Proteiinikinaasi R:n kaltainen kinaasi (PERK engl. PKR-like endoplasmic reticulum kinase)
PBS	Fosfaatilla puskuroitu saliini (engl. Phosphate buffered saline)
PDI	Proteiinidisulfiidi isomeraasi (engl. Protein disulfide isomerase)
<i>Prp</i>	Hiiren prioniproteiini -geeni (engl. Mouse prion protein gene)
RNA	Ribonukleiinihappo (engl. Ribonucleic acid)
RRM	RNA:ta tunnistava osa (engl. RNA recognition motif)
sALS	Sporadinen amyotrofinen lateraaliskleroosi (engl. sporadic ALS)
<i>SOD1</i>	Superoksididismutaasi 1 -geeni (engl. Superoxide dismutase 1 gene)
SOD1	Superoksididismutaasi 1 (engl. Superoxide dismutase 1)
T	Tymiini (engl. Thymine)
TAR	Transaktiivisen vasteen osa (engl. Transactive response element)
TBS	Tris-puskuroitu saliini (engl. Tris buffered saline)
TBS-T	Tris-puskuroitu saliini johon lisätty Tween (engl. Tris buffered saline Tween)
<i>TARDBP</i>	Ihmisen transaktiivisen vasteen DNA:ta sitovan proteiinin 43 -geeni (engl. Transactive response DNA binding protein gene)
mut <i>TARDBP</i>	Mutatoitunut ihmisen transaktiivisen vasteen DNA:ta sitovan proteiinin 43 -geeni
TDP-43	Transaktiivisen vasteen DNA:ta sitova proteiini 43 (engl. Transactive response DNA binding protein 43)
TDP-43- Met ₃₃₇ Val	TDP-43 jonka 337:s metioniini -aminohappo on muuttunut valiiniksi
TDP-43- Ala ₃₁₅ Thr	TDP-43 jonka 315:ta alaniini -aminohappo on muuttunut treoniiniksi
<i>Tardbp</i>	Hiiren transaktiivisen vasteen DNA:ta sitovan proteiini -geeni (engl. Mouse transactive response DNA binding protein 43 gene)
Thr	Treoniini (engl. Threonine)
TIA-1	T-lymfosyyteissä esiintyvä solunsisäinen antigeeni 1 (engl. T-cell-restricted intracellular antigen-1)
<i>tTA</i>	Tetrasykliinista aktivoituva transkriptiotekijä -geeni (engl.

	Tetracycline-controlled transactivator gene)
tTA	Tetrasykliinista aktivoituva transkriptiotekijä (engl. Tetracycline-controlled transactivator)
TRE	Tetrasykliinistä aktivoituva vaste-elementti (engl. Tetracycline response element)
U	Uraasiili (engl. Uracil)
Val	Valiini (engl. Valine)
3'UTR	3-terminaalinen osa (engl. 3' untranslated region)
5'UTR	5-terminaalinen osa (engl. 5' untranslated region)
Met	Metioniini (engl. Methionine)
<i>XBPI</i>	Humaani X-boksiin sitoutuvan proteiini 1 -geeni (engl. X-box binding protein 1 gene)
XBPI	Humaani X-boksiin sitoutuva proteiini 1 (engl. X-box binding protein 1)
%	Prosentti

Sisällysluettelo

1 Johdanto	1
2 Kirjallisuuskatsaus	3
2.1 TDP-43-proteiini	3
2.2 TDP-43 osallistuu geenien ilmentymiseen transkriptionaalisella tasolla	4
2.3 TDP-43 ja siihen liittyvät raakasekvensointi tutkimukset	6
2.4 TDP-43-patologia aivo- ja selkäytimessä	7
2.4.1 TDP-43 ja sen fragmentoituminen	8
2.4.2 Proteaasien merkitys TDP-43:n fragmentoitumisessa	9
2.4.3 C-terminaalisten fragmenttien muodostuminen	10
2.5 Indusoituneista kantasoluista johdetut liikehermosolut ja astrosyytit	11
2.6 TDP-43 ja sen aggregoituminen: prioniproteiinin kaltainen ominaisuus	13
2.7 TDP-43:n merkitys solunsisäiseen kalsiumin tasapainoon	15
2.8 TDP-43 osallistuu hermosolujen ulokkeiden ja aksonien kasvuun	16
2.9 TDP-43 ja mitokondriot	17
2.10 Solulimakalvoston stressi	18
2.11 TDP-43:n lokalisoituminen solulimaan ja stressijyvästen muodostuminen	22
2.12 TDP-43-hiirimallit	23
2.13 TDP-43-rottamallit	25
2.14 Amyotrofisen lateraaliskleroosin TDP-43-Met ₃₃₇ Val-rottamalli	29
2.15 CDNF:n potentiaaliset terapeuttiset ominaisuudet amyotrofisen lateraaliskleroosin hoidossa	30
3 Tutkimuksen tavoite	31
4 Materiaalit ja menetelmät	31
4.1 Eläimet ja eläinten ylläpito	31
4.2 Genotyypin tunnistaminen	32
4.3 Osmoottisten minipumppujen esivalmistelu	32
4.4 Stereotaktinen leikkaus ja osmoottisten minipumppujen asennus	33
4.5 Käyttäytymiskokeet	34
4.5.1 Pyörivä sauva -koe	34
4.5.2 Lokomotoriikan mittaaminen	34
4.5.3 Etukäpälien puristusvoiman mittaaminen	34

4.6 Rottien lopetus.....	35
4.7 Selkäydinnäytteen parafinointi ja aivojen kryopreservointi	35
4.8 Immunohistokemialliset värjäykset	36
4.8.1 Koliiniasetyylitransferaasi vasta-ainevärjäys	36
4.8.2 Stressijyvien vasta-ainevärjäys	37
4.8.3 Humaanin CDNF:n vasta-ainevärjäys.....	38
4.9 Tilastolliset analyysit	38
5 Tulokset	39
5.1 Siirtogeenisten rottien tunnistaminen	39
5.2 Siirtogeenisten rottien karakterisointi.....	39
5.3 CDNF:n krooninen infuusio aivokammioon ja sen vaikutus oireiden esiintymiseen.....	44
5.4 Vasta-ainevärjäykset	46
5.4.1 Koliiniasetyylitransferaasi vasta-ainevärjäys selkäydinleikkeille	45
5.4.2 Stressijyvien vasta-ainevärjäys selkäydinleikkeille.....	48
5.4.3 CDNF:n vasta-ainevärjäys aivoleikkeille.....	49
6 Tulosten tarkastelu ja pohdinta	50
6.1 Siirtogeenisten rottien karakterisointi.....	51
6.2 CDNF:n vaikutus TDP-43-Met ₃₃₇ Val-rottiin	52
6.3 Koliiniasetyylitransferaasi positiiviset hermosolut	53
6.4 Stressijyvien värjäys	55
6.5 CDNF:n diffuusiokoe	57
6.6 TDP-43-patologian hoito amyotrofisessa lateraaliskleroosissa	57
6.7 CDNF:n tutkiminen tulevaisuudessa TDP-43 rottamallilla ja muilla amyotrofisen lateraaliskleroosin tautimalleilla.....	58
7 Yhteenveto ja johtopäätökset.....	60
Kirjallisuusluettelo.....	63

Liitteet

Liite 1: Lopputyössä käytetyt vasta-aineet, värjäys-paketit, proteiinit sekä muut yhdisteet

1 Johdanto

Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) on ylempiä ja alempia liikehermoja rappeuttava keskushermostollinen sairaus (Swinnen ja Robberecht 2014). Prevalenssi sairastua ALS:iin keski-ikässä on suurempi miehillä kuin naisilla (McCombe ja Henderson 2010). Tämä ero kuitenkin tasoittuu iän lisääntyessä, ja vanhemmalla iällä sukupuolten välinen ero häviää. ALS:ia aiheuttaviksi tekijöiksi on yritetty selittää muun muassa ympäristömyrkkyjen ja raskasaineiden altistumisella, tupakoinnilla ja liiallisella liikunnalla (Al-Chalabi ja Hardiman 2013).

ALS voidaan jakaa kliinisestä näkökulmasta bulbaariseen tai selkäydinperäiseen muotoon (Swinnen ja Robberecht 2014). Bulbaarinen muoto viittaa keskiaivoissa tapahtuneeseen liikehermosolujen katoon. Nielemisvaikeudet, artikulointiin liittyvät ongelmat ja kielen faskikulaatiot ("elohiiret") ovat tyypillisiä ensioireita. Toinen on selkäydinperäinen muoto, jossa ensioireet viittaavat selkäytimen liikehermosolujen katoon. Tyypillisiä ensioireita ovat raajojen tai raajan epämääräinen heikkous, kuin myös faskikulaatiot (Swinnen ja Robberecht 2014). Suurin osa ALS-tapauksista ovat sporadisia tapauksia (sALS: engl. sporadic ALS), kun taas vähemmistö ALS-potilaista voidaan yhdistää suvussa esiintyvään muotoon (fALS: engl. familial ALS) (Al-Chalabi ja Hardiman 2013; Swinnen ja Robberecht 2014). fALS-tapaukset voidaan yhdistää mutaatioihin eri geeneissä. Ensimmäinen geeni, jossa pistemutaatiot osoittautuivat aiheuttavan fALS:ia, löytyivät ihmisen superoksididismutaasi 1 (SOD1: engl. Superoxide dismutase 1) -geenissä (*SOD1*) (Rosen ym. 1992).

Muutokset glutamaatin kinetiikassa ja takaisinotossa olivat yksi ensimmäisiä löydöksiä hermoston välittäjäaineiden merkityksessä ALS-potilailla (Rothstein ym. 1992; Rothstein ym. 1995). Häiriintynyt ribonukleiinihappo- (RNA: engl. Ribonucleic acid) prosessointi ALS:issa, on saanut huomiota viimeisen kymmenen vuoden aikana (Arai ym. 2006; Neumann ym. 2006; Kwiatkowski ym. 2009; DeJesus-Hernandez ym. 2011; Renton ym. 2011). Suurimmassa osassa ruumiinavauksesta peräisin olevista ALS-potilaiden aivo- ja selkäydinnäytteissä, esiintyy patologistia muutoksia, jotka viittaavat muuttuneeseen RNA:n prosessointiin.

HI-viruksen lähetti-RNA:n transaktiivisen vasteen osa (TAR: engl. Transactive response element) voi muodostaa vastavuoroisen deoksiribonukleiinihappo- (DNA: engl. Deoxyribonucleic acid) sekvenssin (Ou ym. 1995). Tähän TAR DNA-sekvenssiin sitoutuu molekyylipainoltaan 43 kilodaltonia (kDa: engl. Kilodalton) painava proteiini (TDP-43: engl. TAR DNA binding protein 43). Edellä mainitun lisäksi, tämä proteiini sitoutuu myös RNA:han ja osallistuu geenien ilmentymisen säätelyyn (Buratti ym. 2001; Tollervey ym. 2011; Polymenidou ym. 2011). Hiiren TDP-43 -geenin (*Tardbp*) on osoitettu olevan välttämätön hiiren kehitykselle, koska ilman *Tardbp*:tä hiiren alkio kuolee jo aikaisessa vaiheessa sen kehitystä (Sephton ym. 2010). Mutaatiot TDP-43:ssa muuttaa hermosolujen aksonien ja ulokkeiden dynamiikkaa ja morfologiaa *in vitro* (Fallini ym. 2012; Alami ym. 2014). Tämän lisäksi, mutaatiot vaikuttavat mitokondrioiden jakaantumisen ja yhdistymisen tasapainoon, sekä oksidatiivisen fosforylaation tarvittavien geenien ilmentymiseen (Wang ym. 2013; Wang ym. 2016).

Ruumiinavauksesta saaduilla kudoksenäytteissä on huomattu, että suurimmalla osalla ALS-potilailla esiintyy TDP-43:n lokalisoitumista tumasta solulimaan liikehermosoluissa, hermosoluissa ja gliasoluissa (Arai ym. 2006; Neumann ym. 2006). Näytteissä jotka eivät ole peräisin hermorappeumasairaudesta kärsiviltä potilailta, ei esiinny kyseistä ilmiötä (Mackenzie ym. 2007; Tan ym. 2007). Ihmisen TDP-43 -geenissä (*TARDBP*) esiintyvät mutaatiot ovat harvinaisia, mutta ne voivat kuitenkin aiheuttaa sALS:in (Kabashi ym. 2008; Sreedharan ym. 2008; Van Deerlin ym. 2008; Rutherford ym. 2008).

Tämän lopputyön kirjallisuuskatsaus käsittelee suurimalta osaltaan TDP-43-proteiinia. Katsauksessani käyn läpi yleisesti mitä tiedetään TDP-43:n osallistumisesta geenien ilmentymisen säätelyyn. Kerron myös kuinka mutatoituneiden TDP-43-muotojen toiminta erottuu normaalista TDP-43:sta. Käyn myös läpi solulimakalvoston stressiä ja kuinka se liittyy ALS:iin. Serebraalinen dopamiinisolujen hermokasvutekijä (CDNF: engl. Cerebral Dopaminergic Neural Growth Factor) voi mahdollisesti toimia ALS:ia hidastavana terapeuttisena proteiinina. CDNF voi vaikuttaa solulimakalvoston stressiin ja siksi käsittelen lyhyesti myös sen potentiaalisia terapeuttisia ominaisuuksia.

2 Kirjallisuuskatsaus

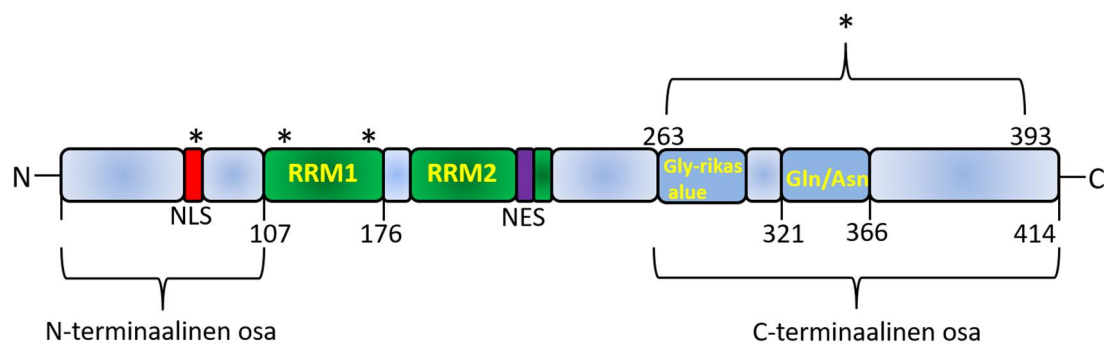
2.1 TDP-43-proteiini

TDP-43:a esiintyy hermokudoksessa, sydämessä, ruoansulatusjärjestelmään kuuluvissa elimissä, immuunipuolustuksen kuuluvissa elimissä ja lisääntymiseen kuuluvissa elimissä (Buratti ym. 2001). Se koostuu 414 aminohaposta (Ou ym. 1995; Buratti ym. 2001). TDP-43 esiintyy pääsääntöisesti solun tumassa (Winton ym. 2008). TDP-43:n amiini-terminaalista osasta (N-terminaalinen osa) löytyy aminohapposekvenssi, jonka avulla se lokalisoituu tumaan (NLS: engl. Nuclear localisation signal) (Ayala ym. 2008; Winton ym. 2008). TDP-43:n karboksyylihappo-terminaalista osasta (C-terminaalinen osa) löytyy puolestaan aminohapposekvenssi, jonka avulla se kulkeutuu tumasta ulos (NES: engl. Nuclear export signal) (Winton ym. 2008). Biokemiallisissa analyyseissä ja soluviljelmissä, on huomattu, että TDP-43 kykenee lokalisoitumaan solulimaan (Ayala ym. 2008). Solulimaan lokalisoituminen voi tapahtua esimerkiksi depolarisoimalla hermosoluja soluviljelmissä (Wang ym. 2008). Hiljattain on huomattu, että TDP-43 voi myös lokalisoitua solun mitokondrioihin (Wang ym. 2016).

RNA:han sitoutuminen onnistuu TDP-43:ssa esiintyvän RNA:ta tunnistavien osien (RRM: engl. RNA recognition motif) avulla (Buratti ym. 2001; Buratti ja Baralle 2001; Ayala ym. 2011). TDP-43 sitoutuu RNA:n urasiilia (U: engl. Uracil) ja guaniinia (G: engl. Guanine) sisältäviin emäksiin biokemiallisissa kokeissa. RNA:han sitoutuminen tapahtuu parhaiten, jos siinä on kaksitoista UG-emästä. Tämän lisäksi TDP-43 tunnistaa myös yksijuovaista DNA:ta, jossa esiintyy tymiiniä (T: engl. Thymine) ja G:stä muodostuvia emäksiä (Buratti ja Baralle 2001). Ensimmäisen RRM:n (RRM1) poistaminen, tai fenyylialaniini-aminohappojen mutatoituminen leusiini-aminohapoiksi RRM1:ssä, estää UG-emäksien tunnistamisen (Buratti ja Baralle 2001). TDP-43:n aminohapposekvenssistä löytyy myös glysiini (Gly: engl. Glycine) rikas alue, jossa esiintyy paljon Gly-aminohappoja. Gly-rikkaalla alueella on merkitystä TDP-43:n toimintaan, koska sen puuttuminen johtaa TDP-43:n kykyyn vaikuttaa geenien ilmentymiseen soluviljelmissä (Wang ym. 2004). TDP-43:sta löytyy myös glutamiinia

(Gln: engl. Glutamine) ja asparagiinia (Asn: engl. Asparagine) sisältävä alue aminohapposekvenssissä, jolla se vuorovaikuttaa muiden RNA:ta sitovien proteiinien kanssa (Budini ym. 2012).

Ilmentämällä ulkoista mutatoitunutta *TARDBP*:tä (mut*TARDBP*), joka sisältää mutaatioita jotka johtaa mutatoituneeseen NLS:ään TDP-43:ssa, johtaa proteiinin lokalisoitumiseen solulimaan (Winton ym. 2008). Samalla se voi aggregoitua sisäisen TDP-43:n kanssa, ja muodostaa huonosti liukenevia (hydrofobisia) proteiiniaggregaatteja (Winton ym. 2008). Mitä enemmän TDP-43:n C-terminaalista osasta puuttuu aminohappoja, sitä vähemmän TDP-43 lokalisoituu tumaan (Ayala ym. 2008). Ensimmäisen tai toisen RRM:n poistaminen, tai RRM:issä olevat aminohappo muutokset, eivät vaikuta TDP-43:n lokalisoitumiseen tumasta solulimaan (Ayala ym. 2008).



Kuva 1. TDP-43:n funktionaaliset osat esitettynä graafisesti. TDP-43 aminohapposekvenssi sisältää kaksi RNA:ta tunnistavaa osaa, sekä tumasta ulos ja sisään kuljettamiseen tarvittavaa osaa. TDP-43:sta löytyy myös Gly-rikas osa aminohapposekvenssistä ja Gln- ja Asn-aminohappoja sisältävä osa. Tähdellä merkityt alueet osoittavat aminohapposekvenssissä osaa, jossa voi esiintyä mutaatioita. Määritelmä N- ja C-terminaalisille osille voivat vaihdella kirjallisuudessa. (Kuva mukaillen Buratti 2015).

2.2 TDP-43 osallistuu geenien ilmentymiseen transkriptionaalisella tasolla

Geenien ilmentymisen säätely tapahtuu osittain transkriptionaalisella tasolla, jossa prekursori-lähetä-RNA:ta ja lähetä-RNA:ta prosessoidaan erilaisten RNA:ta sitovien proteiinien avulla (Mignone ym. 2002). Proteiinit jotka sitoutuvat lähetä-RNA:han,

tunnistavat lähetti-RNA:t niiden sekvenssien ja sekundaari-muotojen perusteella. Esimerkiksi lähetti-RNA:n 5-terminaalinen osa (5' UTR: engl. 5' untranslated region), 3-terminaalinen osa (3' UTR: engl. 3' untranslated region), intronit ja poly-adeniini-häntä ovat esimerkkejä lähetti-RNA:ssa esiintyvistä osista (Mignone ym. 2002). Lähetti-RNA:ssa esiintyy muitakin elementtejä, mutta RNA-biologia ei kuulu tähän lopputyöhön.

TDP-43:n osuutta geenien ilmentymisessä transkriptionaalisella tasolla on tutkittu vertailemalla muutoksia solujen raakasekvensoinnilla (Tollervey ym. 2011; Polymenidou ym. 2011; Xiao ym. 2011; Colombrita ym. 2012). TDP-43 pystyy sitoutumaan lähetti-RNA:n 5' UTR:ään, 3' UTR:ään, introneihin ja ei-koodaavaan RNA:han (Polymenidou ym. 2011; Tollervey ym. 2011; Xiao ym. 2011). Ihmisen kystisen fibroosi -geenin prekursori-lähetti-RNA:n yhdeksannen eksonin poispilkkoutuminen, oli ensimmäisiä löydöksiä, jossa huomattiin TDP-43:n osallistuvan vaihtoehtoiseen pilkkoutumiseen (Buratti ym. 2001).

TDP-43 osallistuu myös ilmentymisensä säätelyyn sitoutumalla omaan lähetti-RNA:han (Ayala ym. 2011; Polymenidou ym. 2011). Ulkoisen *TARDBP*-lähetti-RNA:n yli-ilmentäminen estää sisäisen *TARDBP*-lähetti-RNA:n, ja sisäisen TDP-43:n esiintymistä *in vitro* (Ayala ym. 2011; Polymenidou ym. 2011). Mutatoitunut RRM2 TDP-43:ssa estää sisäisen TDP-43:n ilmentymistä. Sitä vastoin RRM1:ssä esiintyvä mutaatio ei vaikuta TDP-43:n ilmentymiseen. Myös poistamalla Gln:ia ja Asn:ia sisältävä alue TDP-43:sta johtaa sisäisen TDP-43:n ilmentymisen vähentymiseen (Ayala ym. 2011).

RRM1:n poistaminen estää TDP-43:a tunnistamasta muiden geenien lähetti-RNA:n 3'UTR:ää (Colombrita ym. 2012). Edellä mainittujen löydösten perusteella, voi todeta, että varsinkin RRM2:llä on merkitystä *TARDBP*-lähetti-RNA:n ilmentymisen säätelyyn. RRM1:llä on merkitystä muiden geenien lähetti-RNA molekyylien ilmentymisen säätelyssä. Gln:ia ja Asn:ia sisältävä alue puolestaan hienosäätää TDP-43:n ilmentymistä.

2.3 TDP-43 ja siihen liittyvät raakasekvensointi tutkimukset

Ultraviolettisäteilyn avulla voidaan muodostaa kovalentteja sidoksia RNA:n ja sitoutuneen proteiinin välille (Wang ym. 2009). Proteiini-RNA-kompleksi voidaan eristää, jonka jälkeen RNA:sta voidaan muodostaa käänteisellä RNA-polymeraasiketjureaktiolla DNA:ta, josta puuttuu intronit (cDNA: engl. complementary DNA). cDNA-sekvenssien perusteella voidaan etsiä vastaavia sekvenssejä cDNA-tietokannoista (Wang ym. 2009). RNA:ta voidaan vaihtoehtoisesti hybridisoida alustoille, joissa esiintyy tiedetty RNA-sekvenssi. Hybridisoituneet RNA:t selviää emäsjärjestyksen perusteella, ja mille geenille transkripti kuuluu (Polymenidou ym. 2011). Näitä menetelmiä käyttäen, on huomattu TDP-43:n osallistuvan hermosolujen kehittymiselle tarvittavien geenien ilmentymisen säätelyyn (Tollervey ym. 2011; Polymenidou ym. 2011).

Estämällä *Tardbp*:n ilmentymistä hiiren aivoissa, on pystytty hankkimaan tietoa TDP-43:n osallistumisesta geenien säätelyssä hiiressä (Polymenidou ym. 2011). TDP-43 suosii introneihin sitoutumista, ja sitoutuminen tapahtuu yleensä yli 2000 emästä lähimmästä eksoni-introni rajasta prekursori-lähetä-RNA molekyylillä. TDP-43 suosii vähintäänkin neljä toistuvaa UGUG-emäs sekvenssiä, kuin satunnaisia UG-emäksiä samassa prekursori-lähetä-RNA:ssa. UG-emäkset määrittävät kuitenkin vain osittain TDP-43:n sitoutumiskohdan prekursori-lähetä-RNA:han. TDP-43 ei välttämättä sitoudu siihen kohtaan intronia, jossa esiintyy UG-emäksiä. Tämän lisäksi, *Tardbp*:n ilmentymisen hiljentäminen, aiheuttaa pitkiä introneita sisältävien transkriptien vähentymiseen (Polymenidou ym. 2011).

Myös *in vitro* kokeissa, TDP-43 sitoutuu herkemmin UG-emäksiin sisältäviin ryppäisiin RNA:ssa, verrattuna sattumanvaraisesti esiintyviin UG-emäksiin (Tollervey ym. 2011). RNA:ssa voi esiintyä sitoutumiskohtia TDP-43:lle peräti seitsenkertaisesti 200 emäksen pituisesta sekvenssistä (Tollervey ym. 2011). *TARDBP*-lähetä-RNA:n 3'UTR:ssä löytyy esimerkiksi 90 emäksen sekvenssi, josta löytyy UG-emäksistä koostuvia ryppäitä. Tämä selittää osittain miksi TDP-43 kykenee myös osallistumaan ilmentymisensä säätelyyn transkriptionaalisella tasolla (Tollervey ym. 2011). Ulkoisen *TARDBP*:n indusoitunut

ilmentäminen soluissa, lisää TDP-43:n sitoutumista sisäisen *TARDBP*-prekursori-lähetä-RNA:n 3'UTR:ään. Tämä johtaa sisäisen *TARDBP*-prekursori-lähetä-RNA:n vähentyneeseen ilmentymiseen (Polymenidou ym. 2011).

In vitro kokeissa on kuitenkin todettu lajien välisiä eroja tunnistaa UG-emäksiä (Ayala ym. 2005). Humaanin tai banaanikärpäsen TDP-43, joista on poistettu C-terminaalinen osa, vaikuttaa myös proteiinin kykyyn tunnistaa introni-eksoni rajat. Tämä johtaa vaihteleviin RNA:n pilkkoutumistuotteisiin (Ayala ym. 2005).

2.4 TDP-43-patologia aivo- ja selkäytimessä

Ubikitiini-proteiinien liittäminen muihin proteiineihin, on yksi tumallisten solujen tapa käsitellä proteiineja, joiden on tarkoitus muun muassa pilkkoutua proteasomissa (Popovic ym. 2014). Ubikitiini-proteiinin liittäminen muihin solun proteiineihin on lisääntynyt ja häiriöitä niiden pilkkoutumisessa esiintyy monessa keskuhermostollisessa sairaudessa. ALS-potilailla esiintyy ubikitoituneita proteiineja aivotursossa, aivokuoren ja selkäytimen liikehermosoluissa (Arai ym. 2006; Neumann ym. 2006). Ubikitoituneet sulkeumat kolokalisoituvat myös TDP-43:n kanssa. TDP-43-positiivisia sulkeumia voi esiintyä niin tumassa kuin solulimassa (Arai ym. 2006; Neumann ym. 2006). Tämän lisäksi, aivo- ja selkäydinkudoksissa proteiini-aggregaatit ovat huonosti liukenevia. Ne muodostavat erikokoisia proteiini-fragmentteja, jotka ovat TDP-43:n C-terminaalista osaa. Kaiken lisäksi, TDP-43 voi olla myös fosforyloitunut (Neumann ym. 2006; Arai ym. 2006).

Otsa- ja ohimolohkorappeumasta johtuva dementia, -jossa esiintyy ubikitoituneita proteiineja (FTLD-U: engl. Frontotemporal lobar dementia with ubiquitin positive inclusions) on aivorappeumasairaus, jossa esiintyy TDP-43-patologiaa (Arai ym. 2006; Neumann ym. 2006). Myös Alzheimerin tautia sairastavilla ja aivoturson kovettumatautia sairastavilla henkilöillä voi esiintyä TDP-43-patologiaa (Amador-Ortiz ym. 2007). Tämän lisäksi potilaissa, jotka ovat sairastaneet Pickin tautia, joka on myös

otsa ja ohimolohkoja surkastuttava tauti, esiintyy TDP-43-patologiaa (Freeman ym. 2008).

Ruumiinavauksesta saaduista kudoksista on havaittu, että TDP-43:a sisältäviä sulkeumia esiintyy liikehermosolujen ja gliasolujen solulimassa, niin sALS- kuin fALS-potilaissa (Mackenzie ym. 2007). Hermosolujen solulimaan akkumuloitunut TDP-43 näkyy puolestaan tuman sisäisen TDP-43:n vähentymisenä (Mackenzie ym. 2007; Tan ym. 2007). fALS-potilailla, jotka kantavat perimässään mutatoitunutta *SOD1*:tä, ei kuitenkaan esiinny TDP-43-patologiaa (Mackenzie ym. 2007; Tan ym. 2007). Näillä potilailla löytyy kuitenkin ubikitoituneita ja aggregoituneita proteiineja selkäytimessä.

Mutaatio *TARDBP*:ssä on harvinaista ja vuoteen 2015 mennessä on löydetty 52 pistemutaatiota, yksi sekvenssin deletio ja yksi typistynyt muoto (Buratti 2015). Suurin osa todetuista mutaatioista esiintyvät TDP-43:n C-terminaaliosassa (Kuva 1) (Kabashi ym. 2008; Sreedharan ym. 2008; van Deerlin ym. 2008; Rutherford ym. 2008). Arviolta noin kolme prosenttia (%) fALS-tapauksista kantavat mutatoitunutta *TARDBP*:ta, ja puoleltoista prosentilla sALS-tapauksista löytyy mutaatio kyseisessä geenissä. Suurinta osaa löydettyistä mutaatioista ei ole voitu osoittaa johtavan TDP-43:n toiminnalliseen muutokseen (Buratti 2015).

2.4.1 TDP-43 ja sen fragmentoituminen

TDP-43:n fragmentoituminen TDP-43-patologiassa on herättänyt kysymyksen, ovatko ne mahdollisesti sytotoksisia soluille? ALS- ja FTL-D-U-potilaiden liikeaivokuoressa ja aivotursossa esiintyy C-terminaalisia fragmentteja, mutta selkäytimen hermosoluissa nämä ovat harvinaisia (Igaz ym. 2008). TDP-43 ja 25-kDa:n painoiset C-terminaaliset fragmentit voivat olla fosforyloituneina seriini (Ser: engl. Serine) 379:ssä, Ser 403/403:ssä ja Ser 409/410:ssä, ALS- ja FTL-D-U-potilaiden aivokudoksissa (Hasegawa ym. 2008). Fosforyloituneet C-terminaaliset fragmentit ovat löydös FTL-D-U-potilailla, joilla on perinnöllinen mutaatio progranuliini -geenissä (Hasegawa ym. 2008). Mutatoituneiden TDP-43-muotojen ilmentäminen soluissa johtaa liukenemattomien 25-

kDa:n - 35-kDa:n painoisten C-terminaalisten fragmenttien ilmentymiseen (Kabashi ym. 2008; Rutherford ym. 2008). *In vitro* koeasetelmissa on myös huomattu, että mitä lyhyempiä fosforyloituneita C-terminaalisia fragmentteja, sitä huonompi-liukoisia ne ovat biokemiallisissa kokeissa (Igaz ym. 2009). Ser 379, Ser 403/ Ser 404 ja Ser 409/ Ser 410 mutatoituminen alaniini- (Ala: engl. Alanine) aminohapoksi TDP-43:ssa, ei estä C-terminaalisten fragmenttien muodostumista (Nishimoto ym. 2010). Edellä mainittu löydös viittaa siihen, että fosforyloituminen ei ole välttämätöntä C-terminaalisten fragmenttien muodostumiselle. C-terminaaliset fragmentit jotka akkumuloituvat solulimaan estävät lähetti-RNA-molekyylien kuljetusta tumasta solulimaan *in vitro* (Woerner ym. 2016). Yleisesti voi sanoa, että solulimaan poikkeavasti akkumuloituvat proteiinit, jotka tiedetään olevan taipuvaisia aggregoitumaan, estävät lähetti-RNA-molekyylien kuljetusta tumasta solulimaan. Sitä vastoin, tumaan akkumuloituminen ei välttämättä ole soluille yhtä toksista kuin solulimaan akkumuloituminen, ainakaan *in vitro* (Woerner ym. 2016).

2.4.2 Proteaasien merkitys TDP-43:n fragmentoitumisessa

Zhang (2007) tutkimusryhmineen huomasi, että progranuliinin ilmentymisen esto *in vitro*, johtaa TDP-43:n pilkkoutumiseen. Samalla esiintyi 35-kDa:n ja 25-kDa:n painoisia C-terminaalisia fragmentteja sekä aktivoitunut kaspasi 3 (Zhang ym. 2007). Toisaalta, Dormann (2009) tutkimusryhmineen ei huomannut progranuliinin osallistuvan C-terminaalisten fragmenttien muodostumiseen. Näitä fragmentteja ei muodostunut progranuliinin ilmentymisen estosta huolimatta. C-terminaaliset fragmentit olivat heidän tutkimuksen mukaan seurausta kaspasi 3:n aktivoitumisesta, joka on riippumaton progranuliinista (Dormann ym. 2009). Nishimoto (2010) tutkimusryhmineen raportoi puolestaan 25-kDa:n ja 35-kDa:n painoisten C-terminaalisten fragmenttien muodostumisen, olevan kaspasi 3:ta riippumaton tapahtuma *in vitro*. 35-kDa:n painoiset C-terminaaliset fragmentit lokalisoituvat solulimassa sulkeumiin, joissa ne kolokalisoituvat stressijyvälle tunnusomaisten proteiinien kanssa. Näissä sulkeumissa voi myös esiintyä TDP-43:a, joka viittaa siihen,

että C-terminaaliset fragmentit kerää itseensä TDP-43:a (Nishimoto ym. 2010). Stressijyviä ja niiden yhteyttä TDP-43:een käsitellään myöhemmin omassa kappaleessa.

25-kDa:n ja 35-kDa:n painoisten fragmenttien ilmentäminen johtaa sulkeumien muodostumiseen solulimaan (Zhang ym. 2009; Nishimoto ym. 2010). 25-kDa:n painoisten C-terminaalisten fragmenttien Ser 409/ Ser 410 muuttaminen Ala-aminohapoiksi, ei estä sulkeumien muodostumista solulimaan (Zhang ym. 2009). 25-kDa:n painoisten C-terminaalisten fragmenttien esiintyminen *in vitro*, on sytotoksisempaa kuin villityypin TDP-43 (Zhang ym. 2009). Kaspaaseille vastustuskykyiset TDP-43:t ovat myös sytotoksisempia soluille, kuin villityypin TDP-43:t (Zhang ym. 2009; Li ym. 2015). Monet eri kaspaasit osallistuvat TDP-43:n fragmentoitumiseen *in vitro* (De Marco ym. 2014; Li ym. 2015). Kalsiumista riippuvaiset, proteiineja pilkkovat proteaasit ja kalmoduliinit, ovat osoittautuneet myös osallistuvan fragmenttien muodostumiseen (Yamashita ym. 2012). Kalmoduliinit pilkkovat TDP-43:a sen C-terminaalisesta osasta, joka puolestaan johtaa niin kutsuttuihin N-terminaaliin fragmentteihin.

Maininnan arvoinen asia on myös eläinkunnassa esiintyvät erot TDP-43:n aminohapposekvensseissä (Ayala ym. 2005). Humaani kaspaasi 7 pystyy tuottamaan *in vitro* 35-kDa:n painoisia fragmentteja ihmisen TDP-43:sta, mutta ei hiiren TDP-43:sta (De Marco ym. 2014). Vaikka eri lajien TDP-43 ovat samankaltaisia, eivät ne kuitenkaan ole identtisiä. Lajien väliset erot on siis hyvä tiedostaa ja muistaa se mahdollisuus, että erot voivat johtaa poikkeaviin tutkimustuloksiin.

2.4.3 C-terminaalisten fragmenttien muodostuminen

25-kDa:a ja 35-kDa:a painavien C-terminaalisten fragmenttien muodostumista ajan suhteen on myös tutkittu monissa eri julkaisuissa (De Marco ym. 2014; Li ym. 2015; Nonaka ym. 2016; Smethurst ym. 2016). Fragmenttien muodostuminen on indusoitu eri tavoilla, kuten *TARDBP*:n yli-ilmentämisellä, tai altistamalla solulinjoja ihmisen aivokuoresta/ selkäytimestä eristetyillä TDP-43-aggregaateilla. Tulokset poikkeavat

toisistaan, mutta 25-kDa:a ja 35-kDa:a painavat fragmentit muodostuvat kuitenkin kaikissa koe-asetelmissa.

Esimerkiksi Li (2015) tutkimusryhmineen huomasi mut*TARDBP*:n yli-ilmentämisen johtavan ensin 25-kDa:n painoisiin C-terminaalisiin fragmentteihin. Tämän jälkeen muodostuvat 35-kDa:n painoiset fragmentit (Li ym. 2015). 25-kDa:a painavat C-terminaaliset fragmentit voivat muodostua, kun solulimakalvostossa esiintyvä kaspasi 4, pilkkoo TDP-43:a sen 174 aspartaatti (Asp: engl. Aspartate) -aminohapon kohdalta. Solulimakalvostossa esiintyvän kaspasi 4:n jälkeen aktivoituu myös kaspasi 3 ja 7 (Li ym. 2015). Humaanista alkion kantasolulinjasta erilaistuneet liikehermosolut heikentyvät elinkelpoisuutensa puolesta, kun niissä esiintyy TDP-43:a jossa Asp 174 on muutettu Ala -aminohapoksi. Tämä viittaa siihen, että kaspasi 4:n kuuluu pilkkoa TDP-43:a, jotta sytotoksisia vaikutuksia ei esiintyisi (Li ym. 2015). Kaspasi 4 esiintyykin enemmän sALS-potilaiden selkäytimissä, verrattuna verrokkipotilaisiin (Atkin ym. 2008).

Edellä mainitun perusteella voi todeta yhteenvetona, että TDP-43:n fragmentoitumiseen osallistuu monia entsyymejä. Ne pilkkovat TDP-43:a eri kohdista, jonka seurauksena muodostuu erikokoisia fragmentteja. Entsyymit pilkkovat myös kaskaadimaisesti, ajan suhteen TDP-43:a eri kohdista, ja tämä johtaa erikokoisiin fragmentteihin. Näiden fragmenttien muodostuminen voi mahdollisesti olla solujen normaali tapa pilkkoa TDP-43:a. Mikäli ne akkumuloituvat ja ovat fosforyloituneena, voi sillä olla solun kannalta katastrofaalisia seurauksia solulle.

C-terminaalisten fragmenttien sytotoksisuus on kuitenkin kyseenalaista (Igaz ym. 2009). ALS-potilaiden selkäytimessä ei esiinny C-terminaalisia fragmentteja yhtä paljon kuin aivokuorella, mutta selkäytimen liikehermosolut kuitenkin kuolevat pois (Igaz ym. 2009). Hiiret jotka ilmentävät vain loppuosaa *TARDBP*:stä, tuottavat 25-kDa:n painoisia fragmentteja (Caccamo ym. 2012). Näissä hiirissä ei esiinny merkittäviä patologisia muutoksia, kuin vastaavanlaisilla hiirillä, jotka ilmentävät villityypin *TARDBP*:tä tai mut*TARDBP*:tä.

2.5 Indusoituneista kantasoluista johdetut liikehermosolut ja astrosyytit

Ohjelmoimalla fibroblastit uudelleen kantasolutasolle, erilaisten transkriptiotekijöiden ja sopivien kasvatusliuosten avulla, saadaan aikaiseksi indusoituja pluripotentteja kantasoluja (iPSC: engl. Induced pluripotent stem cell) (Bilican ym. 2012; Burkhardt ym. 2013; Serio ym. 2013). Pistemutaatio *TARDBP*:ssä, jossa A emäs 1009 on muuttunut G emäkseksi, johtaa translaatiossa 337:n metioniini (Met: engl. Methionine) -aminohapon vaihtumiseen valiini (Val: engl. Valine) -aminohapoksi (lue Met₃₃₇Val) (Shreedharan ym. 2008). Tämän mutaation ominaisuuksia on verrattu iPSC-soluista muodostuneissa liikehermosoluissa, jotka ovat erilaistuneet kyseistä mutaatiota kantavien fALS-potilaiden fibroblasteista (Bilican ym. 2012). Näissä liikehermosoluissa esiintyy luonnostaan enemmän TDP-43-Met₃₃₇Val-proteiinia ja huonosti liukenevia C-terminaalisia fragmentteja, kuin liikehermosoluissa, jotka ovat luotu terveeltä henkilöltä. *TARDBP*:n ja mut*TARDBP*:n ilmentyminen ei kuitenkaan eroa merkitsevästi toisistaan. TDP-43-Met₃₃₇Val-proteiinia esiintyy puolestaan solulimassa jyvä-muotona. mut*TARDBP*:tä kantavat liikehermosolut ovat myös haavoittuvaisempia kuin terveestä henkilöstä muodostetut liikehermosolut (Bilican ym. 2012).

sALS-potilaiden fibroblasteista muodostetut liikehermosolut ovat myös haavoittuvaisempia (Burkhardt ym. 2013). Näissä liikehermosoluissa muodostuu luonnostaan tuman sisälle TDP-43:a sisältävä aggregaatti. Liikehermosoluissa joiden TDP-43:ssa on Met₃₃₇Val-mutaatio, eivät kuitenkaan muodosta aggregaattia (Bilican ym. 2012). Mutatoitunut TDP-43, jonka Ala -aminohappo 315 on muuttunut treoniini (Thr: engl. Threonine) -aminohapoksi (lue Ala₃₁₅Thr) ei myöskään aiheuta aggregaatteja liikehermosoluissa (Burkhardt ym. 2013).

Myös astrosyyttejä on luotu Met₃₃₇Val-mutaatiota sisältävien henkilöiden fibroblasteista (Serio ym. 2013). Astrosyyttien välillä ei esiinny eroja terveen ja mutatoituneen *TARDBP*:n ilmentymisessä. Astrosyytit eivät myöskään eroa glutamaatin takaisinottokyvyssä.

Yllä mainituista tutkimuksista voi tehdä yhteenvedon ja huomata, että TDP-43 ilman mutaatiota, ei välttämättä omaa samoja sisäisiä ominaisuuksia kuin mutaation sisältävä

TDP-43. mut*TARDBP* ilmentyminen ei poikkea normaalista *TARDBP*:n ilmentymisestä. Sitä vastoin, mutatoitunutta TDP-43:a esiintyy kuitenkin enemmän kuin villityypin TDP-43:a. TDP-43-hiiri- ja rottamallit perustuvatkin *TARDBP*:n tai mut*TARDBP*:n ilmentämiseen, jotta TDP-43:a akkumuloituisi soluihin (katso kappale 2.12 ja 2.13).

2.6 TDP-43 ja sen aggregoituminen: prioniproteiinin kaltainen ominaisuus

Hullun lehmän tauti ja ihmisen Jakob Creutzfeldtin tauti, kuuluvat prioniproteiinin aiheuttamiin aivorappeumasairauksiin (Collinge ym. 1996). Väärin laskostuneiden prioniproteiinien yksi tunnetuimmista ominaisuuksista, on niiden vastustuskyky proteiinia pilkkovaa entsyymien aiheuttamaa pilkkoutumista vastaan. Toinen tunnettu ominaisuus on niiden kyky tartuttaa muut proteiinit aivokudoksessa (Collinge ym. 1996).

Fragmentoituneet ja aggregoituneet TDP-43:t ovat vastustuskykyisiä proteiineja pilkkovia entsyymejä vastaan, sekä ovat taipuvaisia tartuttamaan solun muut TDP-43:t aggregoituneeseen muotoon soluviljelmissä (Guo ym. 2011; Furukawa ym. 2011; Nonaka ym. 2013; Shimonaka ym. 2016; Smethurst ym. 2016). Aggregoituneet muodot muodostavat niin kutsuttuja siemeniä, jotka kykenevät tartuttamaan solun sisällä esiintyvää TDP-43:a, joka johtaa aggregoitumiseen. Siemenet pystyvät tartuttamaan muita soluja, jos ne ilmentävät ulkoista *TARDBP*:ta. Solujen sisäinen *TARDBP*:n ilmentyminen ei johda siementen aiheuttamaan tartuntaan. Siemenet tarvitsevat tavanomaista enemmän solun sisäistä TDP-43:a kuin normaalisti.

Biokemiallisissa kokeissa, joissa on ALS-potilaiden tai FTLT-potilaiden aivokudoksesta eristetty huonosti liukenevia TDP-43:a sisältäviä fraktioita (sisältävät siemenet), voivat aiheuttaa solulinjoissa solunsisäisen TDP-43:n aggregoitumisen (Nonaka ym. 2013). Fosforyloituneet TDP-43:t ja fosforyloituneet C-terminaaliset fragmentit muodostuvat soluissa, kun ne altistetaan siemenille. Inkubointi siementen kanssa aiheuttaa myös dysfunktion solujen proteasomissa, joka vaikeuttaa proteiinien pilkkoutumista soluissa (Nonaka ym. 2013). ALS-potilaiden aivokuorelta eristetyt TDP-

43-siemenet ovat osoittautuneet olevan taipuvaisempia muodostamaan aggregaatteja ja fosforyloitumaan, kuin selkäytimestä eristetyt siemenet (Smethurst ym. 2016). Siementen aiheuttamat aggregaatit, jotka muodostuvat soluissa, voivat myös tartuttaa uudet solulinjat, kun ne altistetaan ensimmäisestä solulinjasta eristetyille fraktioille, jotka sisältävät huonosti liukenevia aggregaatteja.

Niin villityypin kuin mutatoituneella TDP-43:lla, on taipumus aggregoitumiseen, joka selittyy osittain sen aminohapposekvenssistä (Furukawa ym. 2011; Guo ym. 2011; Budini ym. 2012; Shimonaka ym. 2016; Smethurst ym. 2016). Aggregoitumiseen liittyvät ominaisuudet TDP-43:ssa on yritetty selittää osittain sen C-terminaalisen aminohapposekvenssin perusteella. TDP-43:n C-terminaalisen osan ja prioniproteiinin aminohapposekvenssillä on samankaltaisuuksia. Myös mutaatio voi vaikuttaa TDP-43:n kykyyn tartuttaa muita proteiineja (Guo ym. 2011). Mutatoitunut TDP-43-Ala₃₁₅Thr lisää TDP-43:ssa sen sisäistä ominaisuutta omaksua prioniproteiinille tunnusomaisen muodon (Guo ym. 2011). Villityypin ja mutatoituneet TDP-43:t muodostavat myös säikeitä biokemiallisissa kokeissa (Guo ym. 2011; Furukawa ym. 2011). Riippumatta mutaatiosta tai ei, myös C-terminaaliset fragmentit muodostavat säikeitä (Furukawa ym. 2011).

TDP-43:n C-terminaalisen osan aminohapposekvenssin merkitystä aggregoitumiseen ja sytotoksisuuteen on tutkittu myös pienillä synteettisillä peptiideillä (Guo ym. 2011; Budini ym. 2012; Shimonaka ym. 2016). Guo (2011) tutkimusryhmineen huomasi villityypin ja Ala₃₁₅Thr-mutaation sisältävien peptiidien aiheuttavan sytotoksisuutta. Shimonaka (2016) tutkimusryhmineen ei voinut osoittaa vastaavanlaisilla villityypin peptiidien olevan vaikutusta solujen elinkykyyn. Budini (2012) tutkimusryhmineen ei myöskään pystynyt osoittamaan pienten TDP-43:ssa esiintyvien peptiidien avulla solujen elinkyvyn heikkenemistä.

2.7 TDP-43:n merkitys solunsisäiseen kalsiumin tasapainoon

Alfa-amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-isoksatsolipropionihappo (AMPA)-reseptorit ovat solukalvon ionikanavia, jotka osallistuvat muun muassa kalsium-tasojen säätelyyn hermosoluissa (Liu ja Zukin 2007). Selkäytimen liikehermosolut ovat herkempiä kuin muut hermosolut kohonneelle solunsisäiselle kalsiumille (Carriedo ym. 1996). Hiiren liikehermosoluviljelmissä on todettu AMPA-reseptori aktivaation lisäävän suurten liikehermosolujen kuolemaa (Carriedo ym. 1996). AMPA-reseptori alayksikkö R2 (GluR2: engl. Glutamate receptor subunit 2) -geenin (*GluR2*)-lähetin-RNA:n adensiinista inosiiniksi editoinnin puuttuminen, johtaa hiirillä *GluR2*:n ilmentymisen puutteeseen (Higuchi ym. 2000). Tämä editointi tapahtuu adensiinista inosiiniksi editoivan entsyymi B2:n (ADARB2: engl. Adenosine Deaminase RNA specific B2) toimesta. *GluR2*-lähetin-RNA:n editointi, on vähentynyt sALS-potilaiden liikehermosoluissa (Kawahara ym. 2004). ALS-potilaiden selkäytimen liikehermosoluissa voi esiintyä fosforyloitunutta TDP-43:a, joissa ei esiinny ADARB2-entsyymiä (Aizawa ym. 2010). Kaikki liikehermosolut eivät kuitenkaan ole ADARB2-negatiivisia ALS-potilailla, eikä näissä liikehermosoluissa esiinny fosforyloitunutta TDP-43:a. Henkilöillä jotka eivät sairasta ALS:ia, ei esiinny ADARB2-negatiivisia liikehermosoluja (Aizawa ym. 2010). Kaiken lisäksi, raakasekvensoinnilla tehdyssä tutkimuksessa on TDP-43 osoittautunut osallistuvan *ADARB2*:n ilmentymiseen transkriptionaalisella tasolla (Xiao ym. 2011).

Siirtogeenisissä hiirissä, jotka eivät ilmennä *ADARB2*:ta, esiintyy vähemmän TDP-43:a liikehermosoluissa (Yamashita ym. 2012). Näissä hiirissä esiintyy TDP-43:n fragmentoitumista. Estämällä kalpaiinien toimintaa, voidaan estää TDP-43:n fragmentoitumista näillä hiirillä. ADARB2-entsyymien ja TDP-43:n fragmentoitumisen välillä on siis yhteys. Koska ADARB2-entsyymi ei pysty editoimaan *GluR2*-lähetin-RNA:ta, lisääntyy solujen kalsium ionien läpäisevyys, joka lisää kalpaiinien aktiivisuutta. *ADARB2*:n ilmentyminen on pienentynyt sALS potilaiden selkäytimen harmaassa aineessa ja sen liikehermosoluissa (Hideyama ym. 2012).

2.8 TDP-43 osallistuu hermosolujen ulokkeiden ja aksonien kasvuun

Käsitys TDP-43:sta yksinomaan tumaan lokalisoituneena RNA:ta sitovana proteiinina, on muuttumassa. *In vitro* TDP-43 kulkeutuu solun eri osiin mikrotubulusta pitkin hermosolujen somassa, ulokkeissa ja aksoneissa (Wang ym. 2008; Fallini ym. 2012; Alami ym. 2014). Depolarisoimalla hermosoluja, jotka on eristetty rotan aivotursosta, esiintyy TDP-43:n lokalisoitumista hermosolujen ulokkeisiin. Samalla TDP-43 joka on sitoutuneena beta-aktiini -geenin ja kalsium-kalmoduliinikinaasi 2 -geenin (*Camk2a*: engl. Calcium calmodulin dependent kinase 2 a gene) -lähetti-RNA:han, vakauttaa ja estää niiden pilkkoutumista (Wang ym. 2008).

Mutatoituneet TDP-43:t ovat vähemmän liikkuvaisempia kuin villityypin TDP-43:t (Fallini ym. 2012; Alami ym. 2014). Tämän lisäksi, mutatoituneet muodot TDP-43:sta liikkuvat tuman suuntaisesti enemmän kuin villityyppi. Villityyppi etenee enemmän tumasta poispäin hermosolun aksonia pitkin. Toisin sanoen, mutatoituneet TDP-43:t eivät välttämättä suoriudu tehtävästään kuljettaa lähetti-RNA:ta toivotuilla tavalla.

Ulkoisen *TARDBP*:n ilmentäminen ja C-terminaaliset fragmentit vaikuttavat negatiivisesti aksonien pituuteen soluviljelmillä tehdyissä kokeissa (Fallini ym. 2012). Sitä vastoin, TDP-43:n N-terminaaliset fragmentit eivät vaikuta aksonien pituuteen. *TARDBP*:n ilmentymisen hiljentäminen lisää aksonien haaroittumista (Fallini ym. 2012).

TDP-43:n tiedetään myös esimerkiksi sitoutuvan humaanin kevyen neurofilamentti -geenin (*NEFL*: engl. Human neurofilament light chain gene) -lähetti-RNA:n, kuin myös hiiren kevyen neurofilamentti -geenin (*Nefl*: engl. Mouse neurofilament light chain gene) -lähetti-RNA:n 3'UTR:ään (Strong ym. 2007; Polymenidou ym. 2011). Ruumiinavauksesta saaduista selkäydinkudoksista on huomattu ALS-potilaiden liikehermosolujen *NEFL*:n ilmentymisen olevan vähäisempää, kuin kontrollipotilailla (Bergeron ym. 1994). iPSC-liikehermosolujen aksoneissa hiiren *Nefl*-lähetti-RNA kulkeutuu sitoutuneena TDP-43:a sisältävissä proteiini hiukkasissa enemmän tumasta poispäin, kuin tuman suuntaisesti (Alami ym. 2014). Hiiren *Nefl*-lähetti-RNA joka ei

ole sitoutunut TDP-43:een, liikkuu puolestaan enemmän tuman suuntaisesti (Alami ym. 2014).

Yhteenvetona *in vitro* kokeiden perusteella voi spekuloida, että muutokset TDP-43:n toiminnassa vaikeuttaa hermosolujen ulokkeissa tapahtuvaa translaatiota. Tämän voi aiheuttaa suurentunut määrä TDP-43:a, C-terminaaliset fragmentit ja mutatoituneet muodot TDP-43:sta. Toisin sanoen, häiriintynyt lähetti-RNA:n kuljetus, johtuen poikkeavasta TDP-43 toiminnasta, vaikeuttaa hermosoluja ylläpitämään morfologiaansa ja yhteyksiä muihin hermosoluihin.

2.9 TDP-43 ja mitokondriot

Villityypin *TARDBP*:n ja mut*TARDBP*:n ilmentäminen, muuttaa mitokondrioiden dynamiikkaa ja morfologiaa soluviljelmissä (Wang ym. 2013; Wang ym. 2016). Mitokondrioiden ja mutatoituneen TDP-43:n välillä esiintyy enemmän kolokalisaatiota, kuin villityypin TDP-43:n kanssa (Wang ym. 2013). Mitokondrioiden fuusioitumisen ja jakautumisen tasapaino muuttuu rottien primaari-hermosoluviljelmissä. Mitokondriot jakautuvat useammin kuin yhdistyvät, ja tämän lisäksi mitokondriot liikkuvat hitaammin jos soluissa esiintyy tavallista enemmän villityypin TDP-43:a. Mutaatiot TDP-43:ssa lisäävät entisestään tasapainon järkkymistä edellä mainituilla tavoilla (Wang ym. 2013). Mitokondrioiden koot eivät kuitenkaan poikkea aksoneissa, mutta tuojahaarakkeissa ja somassa mitokondriot ovat pienempiä. *TARDBP*:n ilmentymisen hiljentäminen puolestaan lisää mitokondrioiden kokoa somassa ja tuojahaarakkeissa (Wang ym. 2013).

TDP-43-hiirimallissa, jonka TDP-43:ssa on Ala₃₁₅Thr-mutaatio, esiintyy vaikeuksia liikkumisessa kolmen kuukauden kohdalla (Wegorzewska ym. 2009). Mitokondrioiden tuman suuntainen kuljetus iskiashermossa vähenee näissä hiirissä kolmannella viikolla (Magrené ym. 2014). Kolmen kuukauden kohdalla on havaittavissa enemmän mitokondrioita aksonien terminaaliosassa, verrattuna hiiriin jotka eivät ilmennä yllä mainittua mutatoitunutta muotoa. Hermolihasliitosten kohdalla ei kuitenkaan

esiinny muutoksia mitokondrioiden määrässä. Mitokondrioiden koko on pienentynyt, ja ne ovat myös muodostaneet aggregaatteja iskiashermossa kolmen kuukauden kohdalla (Magrené ym. 2014).

Mitokondrioiden muuttunut morfologia selkäytimessä tai hermosolujen aksoneissa, esiintyy hiirimalleilla jotka yli-ilmentävät villityypin *TARDBP*:ta tai mut*TARDBP*:ta (Xu ym. 2010; Janssens ym. 2013). Koska liikehermosolujen täytyy ylläpitää pitkien aksonien energiatarvetta, on ilmeistä, että muutokset mitokondrioiden dynamiikassa aiheuttaa ongelmia.

TDP-43 voi myös lokalisoitua mitokondrioiden sisäkalvoon, jossa se osallistuu mitokondrioiden geenien ilmentymiseen (Wang ym. 2016). Lokalisoituminen mitokondrioihin onnistuu TDP-43:ssa esiintyvien hydrofobisten aminohapposekvenssien avulla. Mutatoituneet muodot TDP-43:sta ovat osoittautuneet häiritsevän mitokondrioissa tapahtuvaa oksidatiivista fosforylaatiota. Mutatoituneet muodot TDP-43:sta estävät mitokondrioissa tarvittavien proteiinien translaatiota. Nämä proteiinit ovat osa ensimmäistä proteiini-kompleksia, joita tarvitaan oksidatiiviseen fosforylaatioon. Myös sALS-potilaiden ruumiinavauksista otetuissa selkäydinnäytteissä on havaittavissa samojen proteiinien vähentynyt esiintyminen (Wang ym. 2016).

2.10 Solulimakalvoston stressi

Solulimakalvoston stressi yhdistetään ALS-patofysiologiaan (Ilieva ym. 2007; Atkin ym. 2008; Honjo ym. 2011). Molekulaarisia mekanismeja liittyen solulimakalvoston stressiin voidaan tutkia kemiallisilla yhdisteillä, jotka lisäävät solulimakalvoston stressiä (Wang ym. 1996; Harding ym. 1999; Haze ym. 1999; Calfon ym. 2002). Väärin laskostuneiden ja laskostumattomien proteiinien määrää monitoroidaan solulimakalvoston lumenissa, solulimakalvoston kalvolla ja solulimassa esiintyvien kaitsijaproteiinien avulla. Alla käsitelen solulimakalvoston stressille olennaisimmat proteiinit.

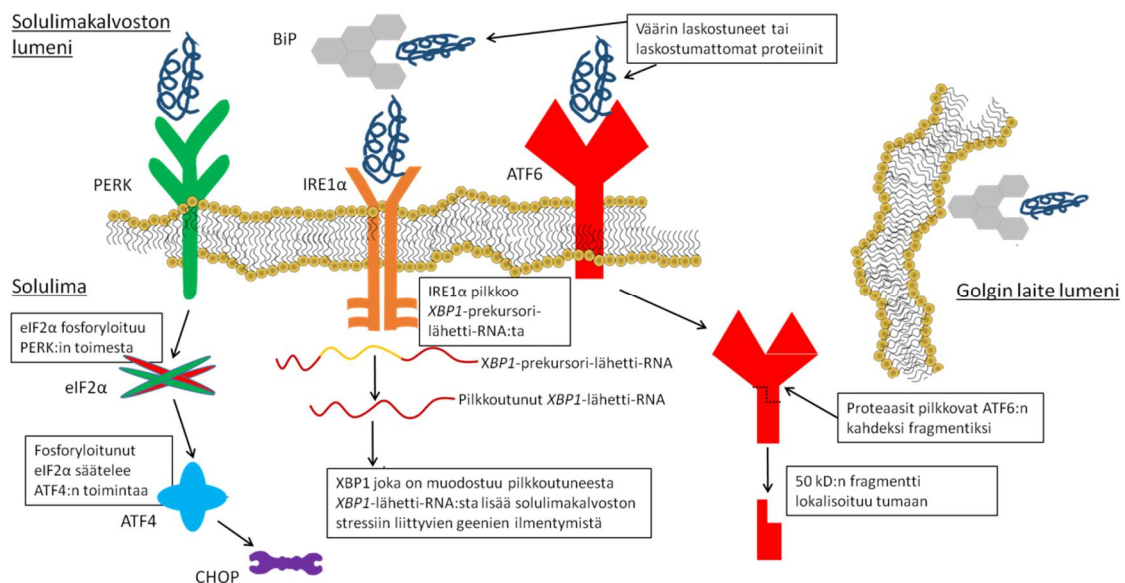
78 kDa:a painava immunoglobuliinin raskaan ketjun tunnistava proteiini (BiP: engl. Immunoglobulin heavy chain binding protein) lokalisoituu solulimakalvostoon ja Golgin laitteeseen (Haas ja Wabl 1983; Bole ym. 1986). BiP -geenin (*BiP*) lisääntynyt ilmentyminen on seurausta väärin laskostuneiden proteiinien akkumuloitumisesta soluun (Wang ym. 1996). Kun väärin laskostuneita proteiineja esiintyy tavallista enemmän, lisääntyy myös C/ EBP samasyntyisen proteiinin (CHOP: engl. C/ EBP homologous protein) esiintyminen. BiP:n esiintyminen lisääntyy, kun CHOP:n esiintyminen laskee. Toisin sanoen, BiP:n lisääntynyt esiintyminen on osittain seurausta CHOP:n aikaisemmin lisääntyneestä esiintymisestä (Wang ym. 1996).

Solulimakalvostossa esiintyy myös proteiinikinaasi R:n kaltainen kinaasi (PERK: engl. PKR-like endoplasmic reticulum kinase), joka aktivoituu solulimakalvostoon kohdistuvasta stressistä (Harding ym. 1999). Tämän seurauksena eukaryootinen initiaatiotekijä-2 alfa (eIF2 α : engl. eukaryotic Initiator factor 2 α) fosforyloituu, joka johtaa translaation vähenemiseen *in vitro*. PERK kykenee myös autofosforylaatioon (Harding ym. 1999).

Aktivoiva transkriptiotekijä 6 (ATF6: engl. Activating transcription factor 6) on 90 kDa:n painoinen glykoproteiini, joka myös esiintyy solulimakalvostossa (Haze ym. 1999). ATF6 pilkkoutuu kahdeksi fragmentiksi, josta 50 kDa:n painoinen fragmentti lokalisoituu tumaan solulimakalvon stressissä (Haze ym. 1999). Fragmentit muodostuvat kahden eri proteaasin toimesta (Ye ym. 2000). Fragmentti, joka lokalisoituu tumaan lisää *BiP*:n ilmentymistä sekä itse BiP:iä esiintyy enemmän (Haze ym. 1999; Ye ym. 2000).

Inositolia tarvitseva entsyymi 1 (IRE1: engl. Inositol requiring enzyme 1) pilkkoo X-boksiin sitoutuvan proteiini 1:n (XBP1: engl. X-box binding protein 1) -geenin (*XBPI*) - lähetti-RNA:ta solulimakalvoston stressissä (Calfon ym. 2002). Vaikka IRE1:n toiminta estyy, ei se estä *XBPI*:n ilmentymistä *in vitro*. Myös CHOP:n esiintyminen pysyy muuttumattomana, vaikka IRE1 ei pystyisi pilkkomaan *XBPI*-lähetti-RNA:ta (Calfon ym. 2002). CHOP:n esiintyminen soluissa liittyy ilmeisesti muiden kaitsijaproteiinien toimintaan, kuten PERK:n ja ATF6:n toimintaan.

Hiiren alkion fibroblasti-solujen aktivoiva transkriptiotekijä 4 (ATF4: engl. Activating transcription factor 4) -geenin (*Atf4*) poistaminen, on osoittanut ATF4:n säätelevän solujen kykyä käsitellä solulimakalvoston stressiä (Harding ym. 2003). Solulimakalvoston stressi johtaa soluviljelmissä, solujen aineenvaihduntaan liittyvien geenien ilmentymisen muutoksiin, sekä oksidatiivista stressiä suojaavien geenien ilmentymisen muutoksiin. *Atf4*-poistogeeniset solut ilmentävät vähemmän aineenvaihduntaan tarvittavia geenejä, ja oksidatiivista stressiä suojaavia geenejä. Fosforyloituneen eIF2 α :n oletetaan säätelevän ATF4:ää, joka välittää muun muassa CHOP:n esiintymistä (Harding ym. 2003). Kaiken kaikkiaan, solut monitoroivat väärin laskostuneiden ja laskostumattomien proteiinien määrää monella eri kaitsijaproteiinilla (Kuva 2).



Kuva 2. Solulimakalvoston stressiin liittyvät keskeiset kaitsijaproteiinit. PERK, IRE1 α ja ATF6 ja lokalisoituvat solulimakalvoston kalvoon, jossa ne monitoroivat ja auttavat proteiinien laskostumisessa. BiP esiintyy solulimakalvoston lumenissa ja Golgin laitteessa. Proteiinikinaasina PERK fosforyloi eIF2 α :n, tai vaihtoehtoisesti itsensä (autofosforylaatio). Fosforyloitunut eIF2 α vähentää yleisesti proteiinien synteesiä solussa, mutta samanaikaisesti ohjaa spesifisemmin ATF4:n toimintaa. ATF4 osallistuu solujen aineenvaihdunnalle tärkeiden geenien, ja oksidatiivista stressiä suojaavien geenien ilmentymistä. IRE1 α pilkkoo *XBP1*-prekursori-lähetin-RNA:sta intronin. Tämän seurauksena muodostuu lähetin-RNA, joka translaatiossa johtaa niin kutsuttuun pilkkoutuneeseen XBP1 transkriptiotekijän muodostumiseen. Pilkkoutunut XBP1 ohjaa muun muassa kaitsijaproteiinigeenien ilmentymistä. ATF6 pilkkoutuu kahdeksi fragmentiksi. Toinen pilkkoutuneista fragmenteista toimii transkriptiotekijänä, joka lisää väärin laskostuneiden proteiinien kaitsemiseen tarvittavia geenejä, kuten *BiP*:iä.

Ruumiinavauksista peräisin olevista selkädinnäytteissä esiintyy fosforyloitunutta eIF2 α :aa sALS-potilailla enemmän, kuin henkilöillä jotka eivät sairasta hermorappeumasairauksia (Ilieva ym. 2007). Proteiinidisulfiidi isomeraasia (PDI: engl. Protein Disulfide Isomerase), joka myös kuuluu kaitsijaproteiineihin, IRE1:tä, PERK:iä ja ATF6:ta esiintyy sALS-potilaiden selkäytimissä (Ilieva ym. 2007; Atkin ym. 2008). PDI:tä esiintyy myös enemmän sALS-potilaiden aivo-selkäydinnesteessä, verrattuna kontrollipotilaisiin (Atkin ym. 2008). TDP-43:n on myös huomattu kolokalisoituvan PDI:n kanssa hermosolujen solulimassa sulkeumiin sALS-potilaiden selkäytimissä (Honjo ym. 2011). PDI presipitoituu myös mutatoituneen TDP-43:n kanssa TDP-43-hiirellä, jolla on Ala₃₁₅Thr-mutaatio (Walker ym. 2013). Sitä vastoin, PDI, BiP, PERK ja pilkkoutunut muoto XBP-1:stä ei kuitenkaan lisäännä TDP-43-rotalla, jolla on Met₃₃₇Val-mutaatio (Tong ym. 2012).

Solulimakalvoston stressiä ja TDP-43:n yhteyttä on myös tutkittu esimerkiksi seeprakalan poikasilla, jotka ilmentävät mut*TARDBP*:ta (johtaa translaatiossa TDP-43:een jonka 348 glysiini -aminohappo on mutatoitunut kysteiini -aminohapoksi) (Vaccaro ym. 2013). Solulimakalvoston stressiä lieventävät farmakologiset yhdisteet, kuten guanabentsi, salubrinaali ja fenasiini, parantavat näiden poikasten uintia, verrattuna poikasiin jotka eivät ole altistuneet näille yhdisteille.

Suzuki ja Matsuoka (2012) huomasivat *in vitro* kokeissa että CHOP:ia esiintyy enemmän soluissa, jotka yli-ilmentävät villityypin *TARDBP*:ta *in vitro*. He eivät havainneet kuitenkaan lisääntyntä ATF4:ää (Suzuki ja Matsuoka 2012). CHOP:in on kuitenkin huomattu lokalisoituvan entistä enemmän solujen tumaan erilaisten mutatoituneiden TDP-43-muotojen läsnä ollessa (Walker ym. 2013).

Yhteenvetona voi todeta, että solulimakalvoston stressi on osa ALS-patofysiologiaa. TDP-43:n ja solulimakalvoston stressin yhteyttä *in vitro* ja *in vivo* kokeissa esiintyy ristiriitaisuuksia. Tämä mahdollisesti johtuu eri tavoista tutkia TDP-43:a ja sen eri muodoista. TDP-43:n ja sen *per se* aiheuttamasta solulimakalvoston stressin välisestä yhteydestä, ei ole paljon todisteita.

2.11 TDP-43:n lokalisoituminen solulimaan ja stressijyvästen muodostuminen

Solujen altistaminen kohonneelle lämpötilalle, oksidatiiviselle stressille tai ultraviolettivalolle, johtaa niin kutsuttujen stressijyvästen muodostumiseen *in vitro* (Kedersha ym. 1999). Fosforyloitunut eIF2 α pystyy indusoimaan stressijyviä soluissa. Stressijyviin kerääntynyt lähetti-RNA oletetaan hidastavan tai estävän translaatiota solulle stressaavassa tilanteessa (Kedersha ym. 1999). Ulkoinen TDP-43 lokalisoituu solulimaan oksidatiivisen, osmoottisen ja solulimakalvoston stressin indusoimisen jälkeen eri solulinjoissa (Barmada ym. 2010; Liu-Yesucevitz ym. 2010; Dewey ym. 2011; McDonald ym. 2011). *In vitro* tehdyissä kokeissa näkyvät stressijyvät solulimassa tuman läheisyydessä pistemäisinä esiintyminä. Solulinjojen sisäinen TDP-43 lokalisoituu myös stressijyviin oksidatiivisessa stressissä (Colombrita ym. 2009; Liu-Yesucevitz ym. 2010). Stressijyviin lokalisoituminen voidaan havaita stressijyvissä esiintyvien tunnusomaisten proteiinien kanssa. TDP-43:n kolokalisoituminen erilaisten stressijyvissä esiintyvien proteiinien kanssa, voi vaihdella riippuen stressin aiheuttajasta. Esimerkiksi oksidatiivinen stressi erilaisissa soluviljelmissä, lisää enemmän TDP-43:n lokalisoitumista solulimaan kuin solulimakalvoston stressi (McDonald ym. 2011). TDP-43 lokalisoituu stressijyviin myös glia-soluissa, jotka on eristetty rotan aivokuoresta (Dewey ym. 2011).

Ulkaisen villityypin tai ALS:iin liittyvien mutatoituneiden TDP-43-muotojen esiintyminen johtaa oksidatiivisessa stressissä stressijyvien muodostumiseen (Liu-Yesucevitz ym. 2010). ALS:iin liitetyt mutatoituneet TDP-43-muodot eivät kuitenkaan spontaanisti johda stressijyvien muodostumiseen, vaan ne tarvitsevat ulkoisen ärsykkeen (Liu-Yesucevitz ym. 2010; Barmada ym. 2010; Dewey ym. 2011; McDonald ym. 2011; Bentmann ym. 2012). Solulimassa esiintyvät mutatoitunutta TDP-43:a sisältävät TDP-43-kertymät, voivat kuitenkin olla suurempia kuin villityypin sisältämät kertymät (Dewey ym. 2011). Myös C-terminaalisten fragmenttien ilmentäminen aiheuttaa stressijyvästen muodostumista (Nishimoto ym. 2010).

Ruumiinavauksista peräisin olevien ALS- ja FTLD-näytteiden immunohistokemiallisten värjäysten tulokset ovat ristiriitaisia (Colombrita ym. 2009; Liu-Yesucevitz ym. 2010).

Colombrita (2009) tutkimusryhmineen ei löytänyt kolokalisaatiota stressijyvien ja TDP-43:n välillä sALS-potilaiden selkäytimistä. Liu-Yesucevitz (2010) tutkimusryhmineen osoittivat kuitenkin TDP-43:n kolokalisoituvan soluliman stressijyväproteiinien kanssa sALS-potilaiden selkäytimissä. Erot näissä kahdessa edellä mainitussa tutkimuksessa mahdollisesti selittynee eri stressijyväproteiineilla, joiden avulla stressijyvät voidaan havaita. Bentmann (2012) työryhmineen on puolestaan osoittanut, että stressijyvästen esiintyminen riippuu täyspitkän TDP-43:n lokalisoitumisesta solulimaan. ALS-potilaiden selkäytimissä esiintyviä TDP-43:a sisältäviä stressijyviä voidaan havaita, mikäli ne sisältävät täyspitkää TDP-43:a. Tämä on esimerkiksi täysi vastakohta Nishimoton (2010) työryhmineen julkaiseman *in vitro* tulosten kanssa. Yksi tunnettu stressijyväproteiini on T-lymfosyyttien solunsisäisen antigeeni 1 (TIA-1: engl. T-cell restricted Intracellular Antigen-1), joka on TDP-43:n tapaan RNA:ta sitova proteiini, joka osallistuu vaihtoehtoiseen prekursori-lähetä-RNA:n pilkkoutumiseen (Izquierdo ja Valcárcel 2007). Sitä esiintyy vaihtelevasti eri kudoksissa ja solulinjoissa, ja tiedettävästi TIA-1:stä esiintyy kahta eri muotoa. Mutaatiot TIA-1:ssä on osoittautunut aiheuttavan niin Welanderin tautia kuin fALS:ia (Hackman ym. 2013; Mackenzie ym. 2017).

2.12 TDP-43-hiirimallit

Niin mut*TARDBP*:ta kuin villityypin *TARDBP*:ta kantavia siirtogeenisiä hiiriä on olemassa (Wegorzewska ym. 2009; Wils ym. 2010; Xu ym. 2010; Igaz ym. 2011; Janssens ym. 2013; Walker ym. 2015). Näiden eläinmallien avulla TDP-43:een liittyvää patologiaa on tutkittu niin käyttäytymiskokeilla, kuin myös molekyylibiologisilla menetelmillä. Yksinomaan C-terminaalisten fragmenttien merkitystä TDP-43-patologiassa, on myös tutkittu hiirimallilla, joissa esiintyy 25-kDa:n painoista fragmenttia (Caccamo ym. 2012). Tässä kirjallisuuskatsauksessa ei ole tarkoitus käydä läpi kaikkia TDP-43-hiirimalleja, vaan antaa yleinen kuva niistä. Siirtogeenisiä hiirimalleja on luotu vuosien varrella, joissa promoottorit ja TDP-43-muodot ovat vaihdelleet (Taulukko 1). Vaihtelemalla promoottoreita, on pyritty luomaan hiiriä,

joiden aivoissa ja selkäytimissä saataisiin aikaiseksi ALS:in kaltainen patofysiologia. Jotkin TDP-43-hiirimallit ilmentävät syntymän jälkeen siirtogeeniä, kun taas toiset ovat ehdollistettuja ilmentämään siirtogeeniä (Taulukko 1).

Kaikki TDP-43-hiirimallit muistuttavat TDP-43-patologialtaan ALS-potilaissa esiintyvää TDP-43-patologiaa, ja kaikki mallit eroavat toisistaan jossakin määrin (Taulukko 1). Patofysiologiset löydökset TDP-43-hiirimalleissa voivat erota toisistaan. Esimerkiksi C-terminaalisia fragmentteja esiintyy vaihtelevasti riippuen promoottorista (Taulukko 1). Solulimassa esiintyvät TDP-43-positiiviset sulkeumat ovat myös hiirimalleissa hyvin vähäisiä.

TDP-43-hiirimallien elinikä-ennusteet vaihtelevat paljon (Wegorzewska ym. 2009; Wils ym. 2010; Xu ym. 2010; Igaz ym. 2011; Janssens ym. 2013; Walker ym. 2015). Erot johtuvat *TARDBP*:n kopiomääristä hiirten perimässä, mahdollisesta mutaatiosta tai siitä kuinka ilmentäminen indusoidaan. Jotkin hiiret ilmentävät *TARDBP*-siirtogeeniä syntymästä alkaen, kun taas toiset ilmentävät sitä tutkijan haluamalla ajankohdalla.

Wegorzewska (2009) työryhmineen loi siirtogeenisen hiirimallin, joka tuottaa syntymästä alkaen mutatoitunutta TDP-43-Ala₃₁₅Thr-muotoa. Ensioireet alkavat kolmen kuukauden jälkeen, ja kuuden kuukauden kohdalla kaikki hiiret ovat jo menehtyneet. Xu (2010) ja hänen työryhmänsä luoma TDP-43-hiirimalli, tuottaa syntymästä alkaen villityypin TDP-43:a. Nämä hiiret menehtyvät jo kahden kuukauden ikäisinä. Wils (2010) työryhmineen loi villityypin TDP-43-hiirikantoja, ja Janssens (2013) työryhmineen loi samankaltaisia TDP-43-Met₃₃₇Val tuottavia hiirikantoja. Eliniät vaihtelevat 21 päivästä lähemmäksi 400 päivään edellä mainittujen hiirien välillä. Hiiret joilla on kaksi kopiota *TARDBP*:tä oireilevat aikaisemmin kuin ne joilla on yksi kopio. Mutatoitunut TDP-43-muoto johtaa yleisesti hiirillä aikaisempaan oireiluun, verrattuna yksilöihin joissa esiintyy saman verran villityypin TDP-43:a. Myös oireiden esiintyminen on voimakkaampaa hiirillä, joilla on lyhyempi eliniän ennuste.

Igaz (2011) työryhmineen ja Walker (2015) työryhmineen ovat puolestaan luoneet ehdollistetusti ilmentäviä, mutatoitunutta NLS:ää sisältäviä, TDP-43-hiirikantoja. Esimerkiksi Walker (2015) ja hänen työryhmänsä luomat hiiret oireilevat viikko sen

jälkeen, kun mut*TARDBP*:ta on ilmennetty. Noin puolet näistä hiiristä menehtyy kymmenen viikon sisällä, ja loput menehtyvät seuraavien kahdeksan viikon aikana.

Joidenkin TDP-43-hiirimallien sopivuutta ALS-malliksi, on pidetty huonoina. Esimerkiksi Wegorzewskan (2009) työryhmineen kehittämä TDP-43-hiirimallin primaari syy kuolemaan, on paksusuolen lomaantumisen (Herdewyn ym. 2014). Nämä hiiret eivät välttämättä koskaan saavuta liikehermosolukatoa, joka voi johtaa virheellisiin tulkintoihin. Siitä huolimatta, tätä hiirimallia on käytetty monissa julkaisuissa jotka liittyvät ALS:iin ja TDP-43:een.

2.13 TDP-43-rottamallit

Villityypin *TARDBP*:ta on ilmennetty rotissa virusvektoreiden ja keinotekkoisten bakteeri-kromosomien avulla, joiden avulla TDP-43:a ei ole kohdennettu esiintymään spesifisiin kudoksiin (Wang ym. 2010; Zhou ym. 2010). Tulokset näissä tutkimuksissa ovat ristiriitaisia. Wangin (2010) työryhmineen tekemä koe johti nuorilla rotilla suureen kuolleisuuteen. Zhou (2010) työryhmineen tekemässä kokeessa ei esiintynyt rottien keskuudessa kuolleisuutta edes 200 päivän ikäisinä. Tulokset johtuvat mahdollisesti eri tavoista ilmentää *TARDBP*:ta. mut*TARDBP*:n kohdentamaton ja ei-ehdollistettu ilmentäminen, johtaa rottien kuolemaan ensimmäisten elinviikkojen aikana (Zhou ym. 2010).

TDP-43-rottien avulla on pyritty kohdentamaan TDP-43-Met₃₃₇Val-proteiinia eri hermosolupopulaatioihin ja hermoston tukisoluihin, käyttämällä erilaisia promoottoreita (Taulukko 2) (Zhou ym. 2010; Huang ym. 2012; Tong ym. 2012; Tong ym. 2013). mut*TARDBP*:ta on pyritty ilmentämään selkäytimen harmaaseen aineeseen käyttämällä promoottoreita, jotka ohjaavat siirtogeenin ilmentymistä hermosoluihin (Zhou ym. 2010; Huang ym. 2012). Vastaavasti mut*TARDBP*:ta on myös pyritty ilmentämään astroosyyteissä (Tong ym. 2013).

mut*TARDBP*:n ilmentäminen (liike)hermosoluissa johtaa rotissa lokomotoriikan vähentymiseen, etukäpälien puristusvoiman heikkenemiseen ja painon laskuun (Zhou

ym. 2010; Huang ym. 2012). Liikehermosolujen määrä on pienempi selkäytimen lumbaaliosalla alueella rotilla, joissa esiintyy TDP-43-Met₃₃₇Val:ia. Solulimassa esiintyy ubikitiinille positiivisia liikehermosoluja selkäytimessä, kuin myös tulehdusta ja astrosytoosia. Rotilla esiintyy myös lihasten ja liikehermojen surkastumista (Zhou ym. 2010; Huang ym. 2012). Jos mut*TARDBP*:ta ilmentyy aivotursossa ja etuaivokuorella, johtaa se muistin heikkenemiseen rotilla, muistuttaen dementiaa (Tong ym. 2012). Hermosolukato on myös näennäistä edellä mainituilla alueilla. Ubikitoituneet proteiiniaggregaatit ovat myös löydös mainituilla aivoalueilla, ja ne lokalisoituvat solulimaan (Tong ym. 2012).

mut*TARDBP*:n kohdennettu ilmentäminen astrosyytteihin, aiheuttaa myös ALS:ia muistuttavia patofysiologisia oireita (Tong ym. 2013). Myös näillä rotilla esiintyy vähemmän liikehermosoluja, lihasten surkastumista ja, astrosytoosia. Näissä rotissa esiintyy vähemmän glutamaatti-kuljettaja proteiinia selkäytimessä (Tong ym. 2013).

Kaikkilla edellä mainituilla TDP-43-rotilla ilmentävät havaitaan TDP-43-Met₃₃₇Val:ia jo muutaman päivän sisällä siirtogeenin aktivoitumisen jälkeen. Kyseessä on hyvin radikaaleja eläinmalleja. Tämän tyyppinen ilmentyminen ei ole verrattavissa fysiologisesti fALS-potilaiden mut*TARDBP*:n ilmentymiseen. Näissä rotissa esiintyvät oireet alkavat myös äkillisesti. Toistaiseksi ei ole olemassa TDP-43-rottamalleja jotka kantaisivat toisenlaista mutaatiota.

Taulukko 1. Siirtogeenisiä TDP-43-hiirimalleja. a) Hiiren prioniproteiini -geenin promoottori. b) Hiiren Thy-1 solun pintaproteiini -geenin promoottori. c) Raskaan neurofilamentti -geenin promoottori.

Lähde	Geenin promoottori	Siirtogeenin ilmentymisen aktivoituminen ja proteiinin muoto	Siirtogeenin ilmentyminen keskushermostossa	Fosforyloituneet TDP-43:t ja C-terminaaliset fragmentit ja niiden esiintyminen	Ubikitoituneet proteiini-aggregaatit
Wegorzewska ym. 2009	a) <i>PrP</i>	Ei ehdollistettu ilmentyminen. Mutatoitunut TDP-43-Ala ₃₁₅ Thr.	Ilmenee aivojen liikeaivokuorella ja aivotursossa. Ilmenee selkäytimessä.	24 kDa:n ja 26 kDa:n painoisten C-terminaalisten fragmenttien esiintyvyys lisääntyy TDP-43 patologian edetessä, niin aivokudoksessa kuin selkäytimessä.	Ubikitoituneita aggregaateja esiintyy varsinkin liikeaivokuoren V-kerroksessa ja aivotursossa. Vähän väli- ja keskiaivoissa ja aivosillassa. Myös selkäytimen etuhaarassa.
Xu ym. 2010	a) <i>PrP</i>	Ei ehdollistettu ilmentyminen. Humaani villityypin TDP-43.	Ilmenee liikeaivokuorella, varsinkin II - VI aivokuoren kerroksessa. Ilmenee myös aivotursossa, aivojuoviossa ja aivorungossa. Ilmenee selkäytimen harmaassa aineessa.	Fosforyloitunutta TDP-43:a esiintyy selkäytimessä ja aivoissa, hermosolujen tumassa ja solulimassa. C-terminaalisia fragmentteja esiintyy aivoissa ja selkäytimessä.	Ubikitoituneita proteiineja esiintyy hermosolujen tumassa ja solulimassa selkäytimessä, ydinjatkeessa, talamuksessa ja ydinjatkeessa.
Igaz ym. 2011	<i>Camk2a</i>	Ehdollistettu ilmentyminen kahdella eri hiirimallilla. Humaani villityypin TDP-43 tai TDP-43 joka sisältää mutaatioita NLS:ssä.	Ilmentävät liikeaivokuorella, aivotursossa ja hajukäämeissä humaania <i>TARDBP</i> :ta, tai mut <i>TARDBP</i> :ta.	Aivokuorella ja aivotursossa esiintyy vähän fosforyloitunutta TDP-43:a. C-terminaalisia fragmentteja ei esiinny.	Hiirten aivokuorella ja aivotursossa, jotka ilmentävät mut <i>TARDBP</i> :ta, esiintyy ubikitoituneita proteiineja solulimassa. Ne kolokalisoituvat fosforyloituneen TDP-43:n kanssa.
Janssens ym. 2013	b) <i>mTyh-1</i>	Ei ehdollistettu ilmentyminen kahdella eri hiirimallilla. Humaani villityypin TDP-43 tai mutatoitunut TDP-43-Met ₃₃₇ Val.	Ilmenee liikeaivokuorella (varsinkin V-kerros liikeaivokuorella), talamuksessa ja aivotursossa ja selkäytimen harmaassa aineessa.	Humaania villityypin <i>TARDBP</i> :ta tai mut <i>TARDBP</i> :tä ilmentävissä hiirissä esiintyy fosforyloitunutta TDP-43:a liikeaivokuoren hermosolujen solulimassa.	Kolokalisoituu harvoin fosforyloituneen TDP-43:n kanssa. Ubikitoituneita proteiineja liikeaivokuorella.

Taulukko 1 (jatkoa). Siirtogeenisiä TDP-43-hiirimalleja. a) Hiiren prioniproteiini -geenin promoottori. b) Hiiren Thy-1 solun pintaproteiini -geenin promoottori. c) Raskaan neurofilamentti -geenin promoottori.

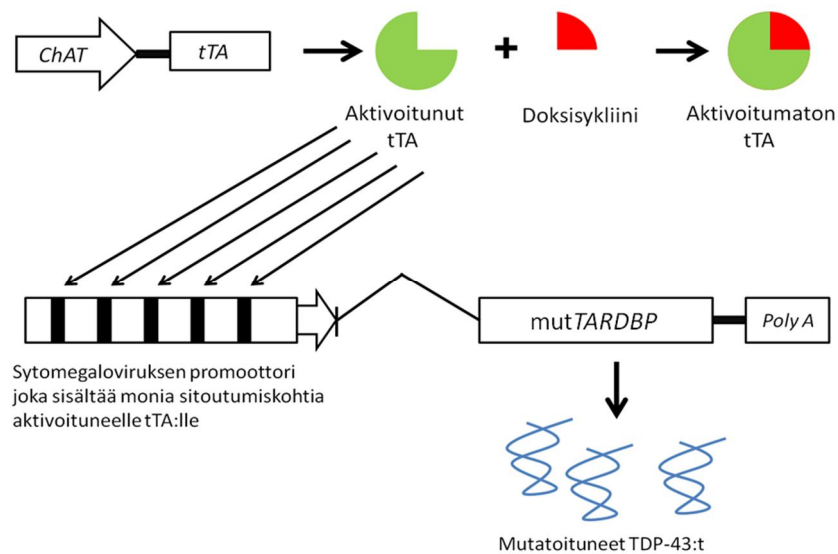
Walker ym. 2015	c) <i>NEFH</i>	Ehdollistettu ilmentyminen. Humaani TDP-43 joka sisältää NLS:ssä mutaatioita.	Ilmenee enimmäkseen aivokuoren V-kerroksen hermosoluissa, aivotursossa, pikkuaivoissa ja hajukäämissä. Satunnaisesti myös liikeaivokuoren astrosyyteissä ja oligodendrosyyteissä. Ilmenee myös selkäytimen liikehermosoluissa.	Fosforyloitunutta TDP-43:a esiintyy aivokuoren, aivotursossa ja selkäytimen hermosolujen solulimassa.	Ei tutkittu.
-----------------	----------------	---	--	---	--------------

Taulukko 2. Siirtogeenisiä TDP-43-rottamalleja. a) Humaani ihmisen raskaan neurofilamentin -geeni. b) Gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini -geeni

Lähde	Geenin promoottori	Siirtogeenin ilmentymisen aktivoituminen ja proteiinin muoto	Siirtogeenin ilmentyminen keskushermostossa	Fosforyloituneet TDP-43 ja C-terminaaliset fragmentit ja niiden esiintyminen	Ubikitoituneet proteiiniaggregaatit
Tong ym. 2012	<i>Camk2a</i>	Ehdollistettu ilmentyminen. Humaani TDP-43-Met ₃₃₇ Val.	Ilmenee etuaivokuoren hermosoluissa ja aivotursossa.	Ei tutkittu/ osoitettu.	Ubikitoituneita proteiiniaggregaatteja esiintyy hermosoluissa jotka ilmentävät mut <i>TARDBP</i> :tä
Huang ym. 2012	<i>ChAT</i> tai a) <i>NEFH</i>	Ehdollistettu ilmentyminen kahdella eri rottamallilla. Humaani TDP-43-Met ₃₃₇ Val.	<i>ChAT</i> -promoottori: selkäytimen ventraalisissa liikehermosoluissa. <i>NEFH</i> -promoottori: liikeaivokuorella, aivotursossa ja selkäytimessä.	35 kDa:n painoisia C-terminaalisia fragmentteja esiintyy rotilla, jotka ilmentävät <i>NEFH</i> promoottorin avulla mut <i>TARDBP</i> :tä.	Liikehermosolujen solulimassa esiintyy ubikitoituneita proteiiniaggregaatteja.
Tong ym. 2013	b) <i>Gfap</i>	Ehdollistettu ilmentyminen. Humaani TDP-43-Met ₃₃₇ Val.	Ilmenee astrosyyteissä aivokuorella, osassa aivotursoa ja selkäytimessä.	Ei tutkittu/ osoitettu.	Ubikitoituneita proteiiniaggregaatteja esiintyy astrosyyteissä jotka ilmentävät mut <i>TARDBP</i> :tä.

2.14 Amyotrofisen lateraaliskleroosin TDP-43-Met₃₃₇Val-rottamalli

Tämä siirtogeeninen ALS-eläinmalli kantaa perimässään hiiren *ChAT*-promootoria (Kuva 3). *ChAT*-promootori säätelee tetrasykliinista aktivoituvaa transkriptiotekijää (tTA: engl. tetracycline-controlled transactivator) geeniiä (*tTA*) (Zhou ym. 2009; Huang ym. 2012). Nämä rotat kantavat myös perimässään sytomegaloviruksen promootoria, johon on liitetty sekvenssejä, joihin tTA sitoutuu. Tämä on niin kutsuttu tetrasykliinistä aktivoituva vaste-elementti (*TRE*: engl. Tetracycline Response Element). *TRE*:hen on fuusioitu mut*TARDBP*:n cDNA:ta, joka johtaa mutatoituneen proteiinin ilmentymiseen (Huang ym. 2012). Doksisykliini estää tTA:n sitoutumista *TRE*:hen. Antibiootin poissaolo puolestaan aktivoi *TARDBP*:n ilmentymistä (Kuva 3) (Zhou ym. 2009; Huang ym. 2012). *ChAT*-promootori mahdollistaa mutatoituneen TDP-43:n ilmentymistä selkäytimen liikehermosoluissa (Huang ym. 2012).



Kuva 3. Siirtogeenit TDP-43-Met₃₃₇Val-rotassa ja mut*TARDBP*:n ilmentymisen aktivoitumismekanismi. Kuvan suorakulmiot esittävät geenejä ja suorakulmion muotoiset nuolet promootoreita. Transkriptiotekijät sitoutuvat alinomaan *ChAT*-promootoriin joka johtaa *tTA*:n jatkuvaan ilmentymiseen. Aktivoitunut tTA sitoutuu sytomegaloviruksen promootoriin joka sisältää *TRE*-sekvenssejä. *TRE*-sekvenssit on kuvattu mustilla pystypalkeilla. Doksisykliinin läsnäolo estää tTA:n sitoutumista *TRE*-sekvensseihin. Sytomegaloviirus promootorin ja mut*TARDBP*:n väliin on liitetty introni. *TARDBP*:n jälkeen on liitetty DNA sekvenssi, josta muodostuu useasta A:ta muodostuva häntä. Kuvan mut*TARDBP* vastaa cDNA:ta eikä genomista *TARDBP*:ta. (Mukaillen Huang ym. 2012).

2.15 CDNF:n potentiaaliset terapeuttiset ominaisuudet amyotrofisen lateraaliskleroosin hoitoon

CDNF on fylogeneettisesti säilynyt hermokasvutekijä, jota esiintyy muun muassa aivoissa kuin myös keskushermoston ulkopuolisissa kudoksissa (Lindholm ym. 2007). CDNF:ää esiintyy solujen solulimakalvostossa, mutta sitä voi myös erittyä solujen ulkopuolelle *in vitro* (Lindholm ym. 2007; Apostolou ym. 2008). CDNF -geenin ilmentyminen ei lisäännä solulimakalvoston stressissä, kuten esimerkiksi mesenkefaalisen hermokasvutekijän lähetti-RNA (Apostolu ym. 2008). Rotasta eristettyjen dopaminergisten solujen altistaminen kemiallisesti aiheutetulle solulimakalvoston stressille, ja samanaikaisesti CDNF:lle, johtaa ATF6 -geenin ilmentymisen vähenemiseen (Voutilainen ym. 2017). Myös *Bip*:n sekä pilkkoutuneen *XBPI*:n ilmentyminen vähenee hiiren ja ihmisen hybridi liikehermosolulinjan soluissa, mutta ne eivät kuitenkaan laske merkittävästi.

Rotan Parkinsonin taudin eläinmallissa, jossa aivojen dopaminergiset hermosolut ja hermoradat tuhoutuvat mustatumakkeessa, voidaan suojata tai eheyttää, antamalla CDNF:ää aivojuovioon (Lindholm ym. 2007; Voutilainen ym. 2011). CDNF vähentää myös hermokudoksessa tulehdusta rotan Parkinsonin taudin eläinmallissa (Nadella ym. 2014). Tässä samassa tautimallissa voidaan myös havaita CDNF:n vähentävän eIF2 α :n fosforyloitunutta muotoa, suhteessa fosforyloitumattomaan muotoon (Voutilainen ym. 2017). Tämä viittaa siihen, että CDNF kykenee estämään translaation estymistä.

Kymmenen mikrogramman CDNF kerta-injektio aivokammioon SOD1-hiirimallilla on todettu lisäävän elinaikaa, parantavan motorista koordinaatiota ja suojaavan liikehermosoluja. Krooninen infuusio aivokammioon parantaa motorisia suorituksia entisestään (Voutilainen ja DeLorenzo, julkaisematon havainto). CDNF-poistogeenisillä hiirillä esiintyy puolestaan motoriikkaan liittyviä puutteita (Lindahl, julkaisematon havainto). CDNF:llä on toisin sanoen ominaisuuksia, joilla on merkitystä liikehermosolujen elinkykyyn.

3 Tutkimuksen tavoite

Yksi lopputyön tavoitteista on karakterisoida TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta. TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat ovat karakterisoitu kirjallisuudessa aikaisemmin (Huang ym. 2012). Koska rotat olivat uusia tutkimusryhmälle, karakterisoitiin ne varmuuden vuoksi uudelleen käyttäytymiskokeilla. Toinen tämän lopputyön tavoitteista on tutkia kuinka krooninen infuusio CDNF:ää aivokammioon, vaikuttaa TDP-43-Met₃₃₇Val-rotan oireiden esiintyvyyteen. Liikehermosolukatoa ja stressijyvasten esiintymistä on tarkoitus tutkia immunohistokemian avulla. CDNF:n diffuusiota aivokammioista tutkitaan myös immunohistokemian avulla.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Eläimet ja eläinten ylläpito

Tämän lopputyön kaikki rotat seurasivat kahdentoista tunnin valoisuus-pimeäaika vuorokausirytmiiä. Rotille oli tarjolla vettä sekä ruokaa *ad libitum*. Siirtogeeniset rotat tunnistettiin korvasta otetulla kudospalalla, josta otettiin DNA-näytteet (Kappale 4.2). Tätä ennen kaikille jälkeläisille ja kantaville emoille annettiin juomaveden mukana doksisykliiniä (Doximysin 20 mg/ ml inj., Orion Pharma) 50 mikrogrammaa millilitraa kohden. Kontrollirottina tässä tutkimuksessa toimi rotat jotka syntyivät samoista pesueista kuten TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat. Nämä rotat voivat kantaa perimässään yhtä siirtogeeniä tai ei kumpaakaan.

Rotat totuteltiin käsittelijään ja kaikkeen laitteistoon joiden avulla niiden terveydentilaa seurattiin. Myös rottien painoa seurattiin säännöllisesti. Ennen stereotaktista leikkausta

suoritettiin samat toimenpiteet. Eläinkokeisiin oli saatu lupa valtakunnalliselta eläinlautakunnalta (ELLA).

4.2 Genotyypin tunnistaminen

Genotyypin tunnistaminen suoritettiin alukkeilla (Oligomer Oy), joiden avulla monistettiin humaanin *TARDBP*:n kolmannen ja viidennen eksonin välistä sekvenssiä. *TARDBP* etualuke: 5'-TCCAAGGCAGAGTTGATGAC-3'. *TARDBP* taka-aluke: 5'-TGAGTTCCAGGCAAACCAAG-3'. *ChAT-tTA*:n monistukseen käytettiin *ChAT-tTA* etualuketta: 5'-CGT GCC TGC TGA TGC CTT GG-3'. *ChAT-tTA* taka-aluke: 5'-TTG GAA ACT GAC AAT CTT AGC-3'. Genotyypityksen suoritti Konsta Valkonen.

4.3 Osmoottisten minipumppujen esivalmistelu

Ihmisen CDNF:ää oli tuotettu rekombinantti-DNA-tekniikan avulla Sf9-hyönteissolulinjalla (Biovian Oy). Osmoottisten minipumppujen (Mini-Osmotic Pump Model 2002, DURECT Corporation, Yhdysvallat) esivalmistelu tehtiin laminaarikaapissa. Leikkausta edeltävänä päivänä täytettiin minipumppujen säiliöt CDNF:llä. Pitoisuus oli kolme mikrogrammaa mikrolitraa kohden liuotettuna steriiliin yksinkertaiseen fosfaatilla puskuroituun saliiniin (1 X PBS). Vaihtoehtoisesti säiliöt täytettiin 1 X PBS:llä. Osmoottinen minipumppu yksikkö koostuu säiliöstä, annoksen säätelijästä johon on liitetty katetri ja siihen liitetty kanyyli (Brain infusion kit 3, DURECT Corporation, Yhdysvallat). Valmiit minipumppu yksiköt säilöttiin siten, että säiliö peittyi steriiliin 1 X PBS:ään.

4.4 Stereotaktinen leikkaus ja osmoottisten minipumppujen asennus

TDP-43-Met₃₃₇Val-rotille, kontrolloitulle ja villityypin rotille suoritettiin leikkaus asettamalla ne stereotaktiseen laitteeseen (Stoelting Co, IL, Yhdysvallat), jonka yhteydessä osmoottinen minipumppu asennettiin ihon alle. TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat ja kontrolloitot leikattiin kahden kuukauden ikäisinä. Rotat leikattiin niiden ollessa isofluraani (Baxter Oy) anestesiassa. Rotat nukutettiin kammiossa 4,5 %:lla isofluraanilla ja ylläpitoannos kaasunaamarissa oli 2,5 %:a. Rottien pääläen alue ajeltiin karvoista ja puhdistettiin klooriheksidiinidiglukonaatilla (0,5 mg/ ml Klorhexol, Unimedica Ab). Paikallisen puudutuksen ja liiallisen verenvuodon tyrehtyttämiseksi, annettiin ajeltuun kohtaan ihonalaisesti lidokaiiniadrenaliinia (10 mg/ ml c., Adrenalin injektioneste, Orion Pharma). Ihoon tehtiin haava ja kallon päälliset kalvot raaputettiin pois pääläen yhtymäkohdan (bregma) esille paljastamiseksi.

Yhtymäkohta toimi origona josta otettiin koordinaatit vasemmanpuoleiseen aivokammioon. Koordinaatit olivat seuraavat: anteriorinen/posteriorinen: -0,8, lateraalinen/ mediaalinen: -1,5 ja dorsaalinen/ventraalinen: -3. Lähialueelle porattiin toiset kolme reikää, joihin ruuvattiin kolme kudosruuvia. Ruuvien tarkoitus on auttaa pitämään kanyyli paikoillaan. Samaan aikaan tehtiin ihon alle lapaluiden väliin tasku, johon oli tarkoitus laittaa pumppu. Kanyyli laskettiin stereotaktisen laitteen avulla vertikaalisesti reikään, ja samaan aikaan pumppu laitettiin sille tehtyyn taskuun ihon alle. Kanyylin lisättiin levikepalat, jotta kanyyli penetroituisi sopivaan syvyyteen aivokammioon. Leikkaushaava suljettiin muutamalla tikillä ja hammassementillä (Aqualox, VOCO), josta tehtiin kakku, joka kiinnitti kanyylin ruuveihin ja kalloon. Toimipiteiden jälkeen annettiin rotille ihon alle buprenofinia (Bupaq multidose vet 0,3 mg/ ml, Richter pharma) 0,05 milligrammaa painokiloa kohden ja rimadylia (Rimadyl vet 50 mg/ ml, Zoetis) 0,5 milligrammaa painokiloa kohden. Rotat siirrettiin lämpökammioon palautuakseen leikkauksesta. Rotat pidettiin yksittäisissä häkeissä leikkauksen jälkeen. Stereotaktiset leikkaukset suorittivat Francesca DeLorenzo ja Merja Voutilainen. Rottien vointia seurattiin kokeiden ajan ja niiden voinnin heikennyttyä, tarjottiin kosteata ruokaa ja geeliä, joka korvasi veden.

4.5 Käyttäytymiskokeet

4.5.1 Pyörivä sauva -koe

Pyörivä sauva -koe suoritettiin pyörivä sauva -laitteella (Rota Rod, Ugo Basile, Italia) ja toteutettiin siten, että rotat totuteltiin pyörivällä sauvalla kävelyyn vakionopeudella kahdeksan kierrosta minuutissa pari päivää ennen karakterisoinnin alkua, tai ennen leikkausta. Sauvan alkunopeus oli kahdeksan kierrosta minuutissa ja kiihtyi neljän minuutin ajan 40 kierrokseen minuutissa. Jos rotta putosi sauvalta ensimmäisen minuutin aikana, se nostettiin takaisin, jos arvioitsija huomasi sen kuitenkin kykenevän jatkamaan. Päätepiste oli rotan putoaminen tai täydet neljä minuuttia pyörivällä sauvalla.

4.5.2 Lokomotoriikan mittaus

Rotat laitettiin läpinäkyviin laatikoihin pimeään, jonka aikana niiden kokonaismatkaa ja takajaloille nousua seurattiin yhden tunnin ajan. Rottien aktiivisuutta analysointiin Med Associates inc® Activity monitor 7 tietokoneohjelmiston avulla.

4.5.3 Etukäpälien puristusvoiman mittaaminen

Rottien etukäpäliä annettiin tarttua poikittaiseen palkkiin, joka monitoroi puristusvoimaa (Chatillon DFE II, Ametek, Yhdysvallat) jonka jälkeen kokeen suorittaja veti rottaa vastakkaiseen suuntaan, kunnes rotta irrotti otteensa. Jokaiselle rotalle suoritettiin kolme toistoa, josta paras tulos otettiin huomioon.

4.6 Rottien lopetus

TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat lopetettiin, kun ne eivät kyenneet liikkumaan eturaajojen avulla, eivätkä kyenneet suoristumaan jaloilleen, kun ne kaadettiin kyljelleen. Kaikkien eri kokeiden rotat lopetettiin myös, jos niiden yleisvointi heikkeni nopeasti.

Rotalle annettiin vatsaonteloon pentobarbitaalia (Mebumat vet 60 mg/ ml, Orion Pharma) 90 milligrammaa painokiloa kohden, kuusinkertaisena laimennoksena sen ärsyttävän ominaisuuden takia. Rotan kipurefleksien häviämisen jälkeen, rintaontelo aukaistiin ja sydämen vasempaan kammioon pistettiin neula ja rotta perfusoiitiin huoneenlämpöisellä 1 X PBS:llä viisi minuuttia. Tämän jälkeen 1 X PBS vaihdettiin huoneenlämpöiseen, 4 %:een formaliiniin sekoitettuna 1 X PBS:ään ja perfusoiitiin kymmenen minuuttia. Rotan pää katkaistiin giljotiinilla, ja aivot sekä selkäydin otettiin talteen ja säilytettiin 4 %:ssa formaliinissa +4 celsiusasteessa (C°). Formaliini-liuos vaihdettiin kolmen päivän väliajoin. Kudokset pidettiin formaliinissa vähintään viikko ennen parafiiniin upottamista.

4.7 Selkäydinnäytteen parafinointi ja aivojen kryopreservointi

Pala lumbaalista aluetta selkäytimestä otettiin talteen, jonka jälkeen se pestiin 1 X PBS:ssä. Selkäydin esikäsiteltiin pesuilla ja parafiinissa yön yli. Seuraavana päivänä näytteet upotettiin parafiiniin ja jäädytettiin. Kymmenen mikrometriä paksuja poikittaisia leikkeitä leikattiin mikrotomilla (HM355 S Automatic Microtome, Thermo Scientific™, Saksa) mikroskooppilevyille (Superfrost ultra plus, Menzel-Gläser). Selkäytimen lumbaalisen alueen tunnistamiseen käytettiin apuna selkäydin-atlasta (Sengul ym. 2013). Mikroskooppilevyt jätettiin yön yli +37 °C:een kuivumaan. Seuraavana päivänä mikroskooppilevyt laitettiin kymmeneksi sekunniksi lämpölevylle, jotta mahdolliset viimeiset vedet haihtuisivat pois. Leikkeet säilöttiin +4 °C:ssa immunohistokemiallista värjäystä varten.

Diffuusiokokeeseen käytetyt aivot säilöttiin 30 %:ssa sukroosiliuksessa, kunnes niistä leikattiin 40 mikrometriä paksuja aivoleikkeitä. Leikkeet säilöttiin -20 °C:ssa.

4.8 Immunohistokemialliset värjäykset

4.8.1 Koliiniasetyylitransferaasi vasta-ainevärjäys

Leikkeet puhdistettiin parafiinista laittamalla ne ksyleeniin, jonka jälkeen ne laitettiin absoluuttiseen etanoliin (Altia Oyj). Tämän jälkeen näytteet laitettiin etanoliliuoksiin, joiden etanolipitoisuus laski, ja lopulta ne laitettiin puhdistettuun ionipitoiseen veteen.

Seuraavaksi näytteet käsiteltiin 30 minuuttia kuumalla, kymmenen millimolaarisella, natriumsitraatti (Sigma Aldrich) puskurilla johon oli lisätty saippuaa (Tween 20, Sigma-Aldrich) 0,005 %:a ja pH-arvo säädetty kuuteen

Tämän jälkeen näytteet pestiin yksinkertaisella tris-puskuroidulla saliini (1 X TBS) liuoksella 15 minuuttia. Jotta näytteiden sisäinen peroksidaasi aktiivisuus saataisiin estettyä, käsiteltiin näytteet 1 X TBS liuoksella joka sisälsi 0,5 %:a vetyperoksidia (Sigma-Aldrich) 30 minuutin ajan, ja pestiin kolme kertaa kymmenen minuutin ajan 1 X TBS-Tween 0,1 %:lla liuoksella (1 X TBS-T). Pesun jälkeen näytteet blokattiin 1 X TBS-T 1,5 %:lla kanin seerumilla (Vectastain PK-4005, Vector Laboratories) yhden tunnin ajan huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteet inkuboitiin vuohessa tehdyissä primaari vasta-aineissa (1:500, AB 144P, Millipore) 1 X TBS-T 1,5 %:lla kanin seerumilla yön yli +4 °C:ssa.

Seuraavana päivänä näytteet pestiin kolme kertaa kymmenen minuuttia 1 X TBS-T:llä. Tämän jälkeen näytteet inkuboitiin 1 X TBS-T 1,5 %:lla kanin seerumilla, joka sisälsi kanissa tehtyjä biotinyloituja anti-vuohi vasta-aineita (1:200, Vectastain PK-4005). Inkubointi tehtiin huoneenlämmössä yhden tunnin ajan. Näytteet pestiin kolme kertaa kymmenen minuuttia, ja inkuboitiin biotiini-avidini-piparjuuri-peroksidaasi

kompleksilla (Vectastain PK-4005) 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. Seuraavaksi näytteet pestiin kolme kertaa kymmenen minuuttia 1 X TBS-T:llä. Pesujen jälkeen, näytteet käsiteltiin 3,3-diaminobentsidiinillä (Vectastain PK-4100, Vector Laboratories) valmistajan ohjeiden mukaan. Piparjuuri-peroksidaasi katalysoi reaktion, jossa muodostuu ruskeaa presipitaattia. Reaktio pysäytettiin pesemällä näytteet kolme kertaa viisi minuuttia 1 X TBS:llä. Vasta-aineiden spesifisyys tutkittiin jättämällä primaari tai sekundaari vasta-aine pois värjäyksistä.

Lopuksi näytteet käsiteltiin ionisoidulla vedellä, ja dehydroitiin etanoliliuoksilla, joiden etanolipitoisuudet nousivat. Näytteet käsiteltiin ksyleenillä, ja peitelasit (Heinz Herenz) laitettiin mikroskooppilevyjen päälle liimalla (Coverquick 2000).

ChAT-positiiviset hermosolut laskettiin selkäydinkanavasta katsottuna, etupilarin vasemmasta ja oikeasta ventraalisesta osasta. Selkäytimen lumbaalisen kolmannen ja viidennen nikaman välinen alue tunnistettiin selkäydin-atlaksen avulla. Kuvat aivoleikkeistä otettiin Pannoramic 250 Flash III kuvaskannerilla (3DHISTECH).

4.8.2 Stressijyvien vasta-ainevärjäys

Stressijyvien esiintymistä tutkittiin havaitsemalla TIA-1:n esiintymistä, jota esiintyy stressijyvissä. Värjäys suoritettiin samalla tavalla kuin ChAT-värjäys, mutta blokkausseerumi koostui 5 %:lla kanin seerumilla 1 X TBS-T:llä. Primaari vasta-aine oli tuotettu vuohessa (1:50, C-20: sc-1751, Santa Cruz Biotechnology) ja sekundaari vasta-aine kanissa (Vectastain PK-4005). Vasta-aineiden spesifisyys tutkittiin jättämällä primaari tai sekundaari vasta-aine pois värjäyksistä. Kuvat otettiin kameralla (Olympus U-CMAD3) joka oli liitetty mikroskooppiin (Olympus BX51).

4.8.3 Humaanin CDNF:n vasta-ainevärjäys

Aivoleikkeet pestiin 1X TBS:llä kolme kertaa. Tämän jälkeen kudokset keitettiin 30 minuuttia +80 °C:lla kymmenen millimolaarisella natriumsitraatti puskurilla (pH-arvo kuusi) johon oli lisätty saippuaa 0,005 %:a. Keittämisen jälkeen jätettiin leikkeet jäähtymään 15 minuutiksi. Leikkeet pestiin kolme kertaa 1 X TBS-T:llä, jonka jälkeen leikkeet blokattiin 20 minuuttia 1,5 %:lla vuohen seerumilla 1 X TBS-T:ssä. Kudokset inkuboitiin kanissa tehtyjen primaari vasta-aineiden (1:500, anti-hCDNF DDV1, Icosagen) kanssa blokkauseerumissa yön yli +4 °C:ssa.

Leikkeet pestiin kolme kertaa 1 X TBS-T:llä ja inkuboitiin sekundaari anti-kani vasta-aineilla (1:200, Vectastain PK-4001, Vector Laboratories) blokkauseerumissa huoneenlämmössä tunnin ajan. Loput vaiheet värjäyksessä suoritettiin kuten ChAT-värjäyksessä. CDNF:n diffuusion laajuuden mittaamiseksi käytettiin apuna rotan aivo-atlasta (Paxinos ja Watson 1986).

4.9 Tilastolliset analyysit

Kaikista käsittelyryhmistä laskettiin keskiarvot ja keskiarvojen virheet Microsoft Office Excel® 2010 ohjelmalla. Painon muutokset laskettiin % muutoksena rotan alkupainosta kokeen alkaessa (Kaava 1).

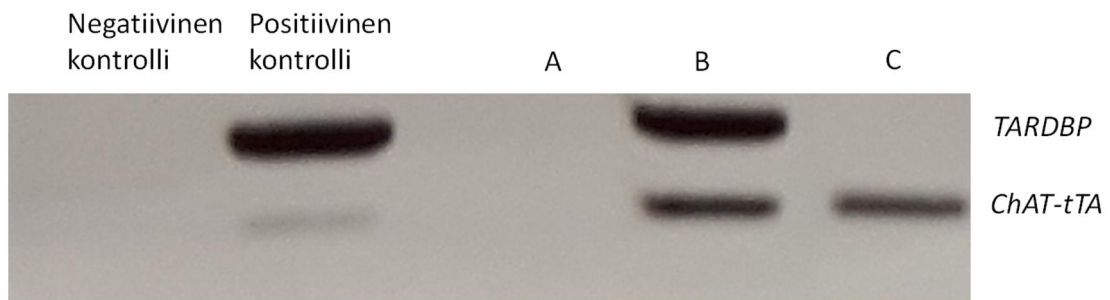
$$(\text{Kaava 1}) [((\text{aloitus paino}) - (\text{mitatun päivän paino})) / (\text{aloitus paino})] * 100 \%$$

Mittaustulosten kuvien tekemiseen käytettiin GraphPad Prism 6 ohjelmaa. Toistettujen mittausten varianssianalyysi (ANOVA: engl. Analysis of Variance) tehtiin karakterisointiosuuden TDP-43-Met₃₃₇Val-rotille ja kontrollirotille IBM SPSS 21:llä. Tilastollisesti merkittäväksi eroksi laitettiin $p < 0,05$.

5 Tulokset

5.1 Siirtogeenisten rottien tunnistaminen

Siirtogeeniset rotat tunnistettiin niiden genotyypin mukaan (Kuva 4). Rotat jotka kantoivat perimässään siirtogeeniä, pystyttiin tunnistamaan agaroosigeelillä elektroforeesin avulla.

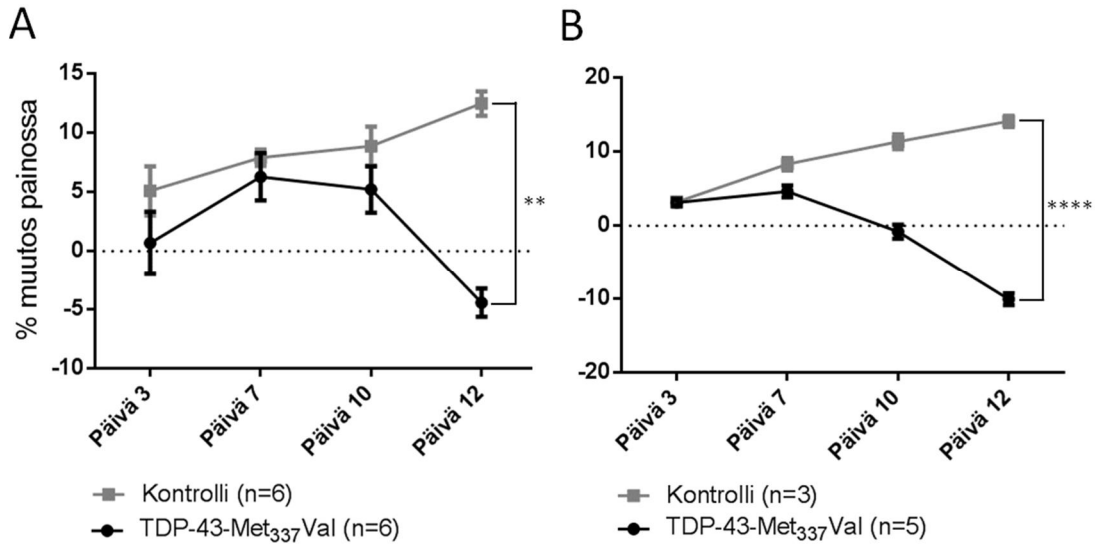


Kuva 4. Genotyyppien tunnistaminen. Negatiivisena kontrollina toimi villityypin rotasta otettu kudospala. Positiivisena kontrollina toimi kudospala joka oli eristetty rotasta, joka kantoi *TRE-TARDBP*:tä ja *ChAT-tTA*:ta. Kuvassa esimerkki saman poikueen kolmesta eri rotasta, joista on otettu kudospala, osoittaa yksilön joka ei kanna siirtogeenejä (A), yksilön joka kantaa molempia siirtogeenejä (B) ja yksilön joka kantaa vain toista siirtogeeniä (C).

5.2 Siirtogeenisten rottien karakterisointi

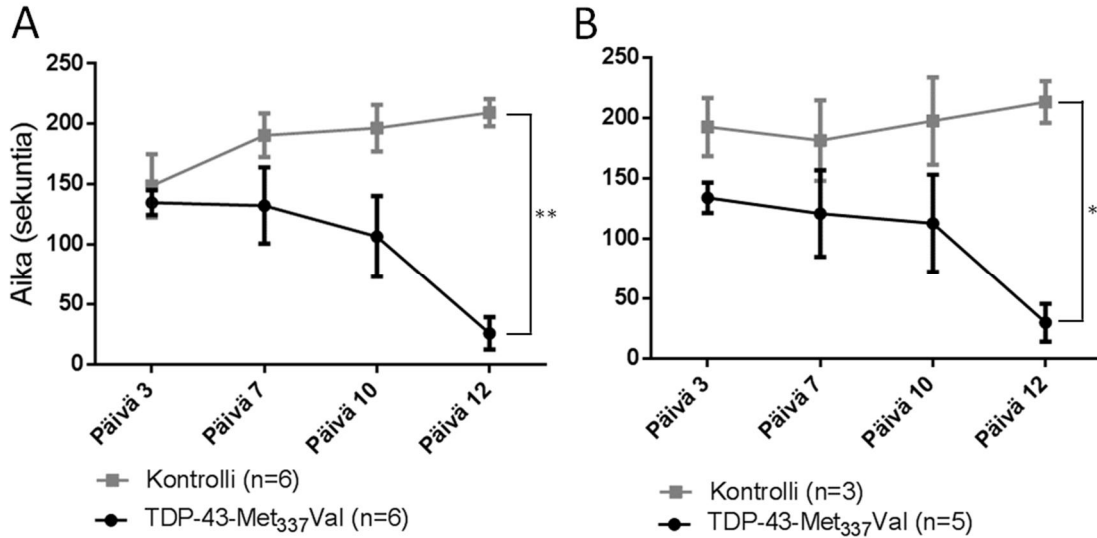
TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilta poistettiin doksisykliiniä sisältävä vesi 60 päivän ikäisinä. Rottien painoa, lokomotoriikkaa ja etukäpälien puristusvoiman voimakkuutta tutkittiin. TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat olivat lähtökohdaltaan pienempiä ja kevyempiä kuin kontrolloitot rotat jotka olivat samasta pentueesta. Molemmista ryhmissä esiintyi painon nousua ensimmäisen seitsemän päivän aikana. Tämän jälkeen painon lasku oli ilmeistä

ja tilastollisesti merkittävä (toistettujen mittausten ANOVA, **** $p < 0,0005$) (Kuva 5 A). TDP-43-Met₃₃₇Val-uroksilla painon pudotus alkaa jo kymmenentenä päivänä (toistettujen mittausten ANOVA, **** $p < 0,0005$) (Kuva 5 B).



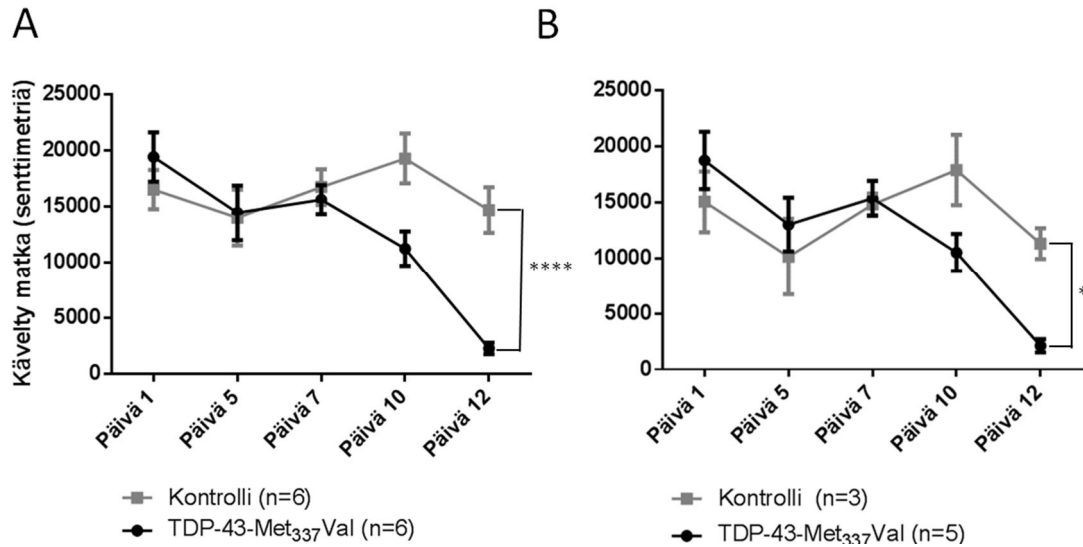
Kuva 5 A ja B. Painon muutos rotilla ajan suhteen. A) TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien (n=6) laihtuminen alkaa kymmenen päivää doksisykliinin poiston jälkeen (Mauchlyn sfäärisyys testi: $\chi^2(5) = 20,212$, $p = 0,001$. Toistettujen mittausten ANOVA $F(1,10) = 13,216$, ** $p = 0,004$). Kontrollirottien paino ei laske. B) Painon muutos ajan suhteen TDP-43-Met₃₃₇Val-uroksilla (n=5) ja uros kontrollirotilla (n=3) (Mauchlyn sfäärisyys testi: $\chi^2(5) = 1,489$, $p = 0,916$. Toistettujen mittausten ANOVA Greenhouse-Geisser korjauksella $F(2,546, 15,276) = 89,664$, **** $p = 0,0005$). Painon muutokset esitetään % muutoksena. Kuvattuna keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet.

TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat suoriutuivat pyörivä sauva -kokeesta heikommin kuin siirtogeeniset rotat jotka toimivat kontrollirottina (Kuva 6 A). Seitsemän päivää doksisykliinin poisjättämisen jälkeen, TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat selviytyivät heikommin kuin saman pentueen kontrollirotat (toistettujen mittausten ANOVA, ** $p = 0,002$). Kaksi päivää myöhemmin TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat ovat käytännössä kykenemättömiä pyörivä sauva -kokeeseen. Uros -kontrollirottien ja TDP-43-Met₃₃₇Val-urosrottien suoriutuminen on lähes identtinen verrattuna naaraista ja uroksista koostuvien ryhmien kanssa (toistettujen mittausten ANOVA, * $p = 0,037$) (Kuva 6 B).



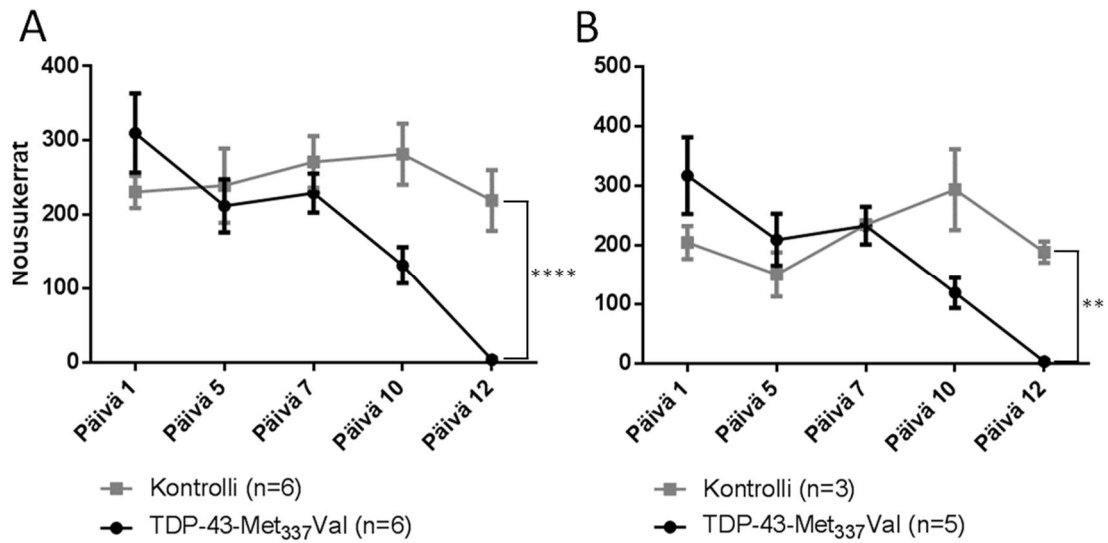
Kuva 6 A ja B). Pyörivä sauva -koe. A) TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (n=6) suoriutuvat tilastollisesti heikommin pyörivällä sauvalla, kuin saman pentueen kontrollirotat (n=6) (Mauchlyn sfäärisyys testi: χ^2 (5) = 9,161, $p = 0,105$. Toistettujen mittausten ANOVA Greenhouse-Geisser korjauksella F (1,766, 17,662) = 9,314, ** $p = 0,002$). B) TDP-43-Met₃₃₇Val-urokset suoriutuvat tilastollisesti merkittävästi heikommin kuin kontrolli-urokset (Mauchlyn sfäärisyys testi: χ^2 (5) = 24,677, $p = 0,0005$. Toistettujen mittausten ANOVA F (3,16) = 3,503, * $p = 0,037$). Kuvattuna keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet.

TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien liikkuminen väheni, verrattuna kontrolleihin tilastollisesti merkittävästi kymmenen päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen (toistettujen mittausten ANOVA, **** $p = 0,0005$). Kontrolliryhmän rotat olivat kokeiden ajan liikkuvaisempia kuin TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (Kuva 7 A). TDP-43-Met₃₃₇Val-urosten liikkuminen verrattuna kontrolliuroksin heikkeni kaksitoista päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen (toistettujen mittausten ANOVA, * $p = 0,015$) (Kuva 7 B). Takaraajojen heikkenemien näkyi myös takaraajoille nousemisen vähentymisenä (toistettujen mittausten ANOVA, $p = 0,0005$). TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat nousevat vähemmän kuin kontrollirotat kymmenen päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen (Kuva 8 A). Kontrolli- ja TDP-43-Met₃₃₇Val-urosten ero on myös selvä kymmenen päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen (Kuva 8 B) (toistettujen mittausten ANOVA, $p = 0,006$).



Kuva 7 A ja B). Liikeaktiivisuus yhden tunnin ajan pimeässä. A) Kymmenen päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen, johtaa TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien liikeaktiivisuuden heikkenemiseen (Mauchlyn sfäärisyys testi: χ^2 (9) = 12,186, p = 0,211. Toistettujen mittausten ANOVA Greenhouse-Geisser korjauksella F (2,29, 22,93) = 10,95, **** p = 0,0005). B) Urosten liikeaktiivisuus yhden tunnin ajan pimeässä. Kaksitoista päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen johtaa TDP-43-Met₃₃₇Val-urosten (n=5) liikeaktiivisuuden heikkenemiseen verrattuna uros kontrollirottiin (n=3) heikkenemiseen (Mauchlyn sfäärisyys testi: χ^2 (9) = 7,05, p = 0,657. Toistettujen mittausten ANOVA Greenhouse-Geisser korjauksella F (2,08, 12,50) = 5,86, * p = 0,015). Kuvattuna keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet.

Etukäpälien puristusvoiman mittaaminen ei osoittanut tilastollisia eroja TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien ja kontrollirottien välillä. Tilastollisia eroja ei myöskään esiintynyt urosten välillä. Eräs merkille pantava ominaisuus TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla, on niissä esiintyvä purppuran erittymien silmäkulmista (chromodachryorrhea). Purppuran erittyminen alkaa samoihin aikoihin kuin rottien liikkuminen heikkenee. Myös niskan alueella voi olla havaittavissa turkin värjäytymistä purppuraksi. Purppura tummuu silmän ympärillä sen kuivuttua (Kuva 9).



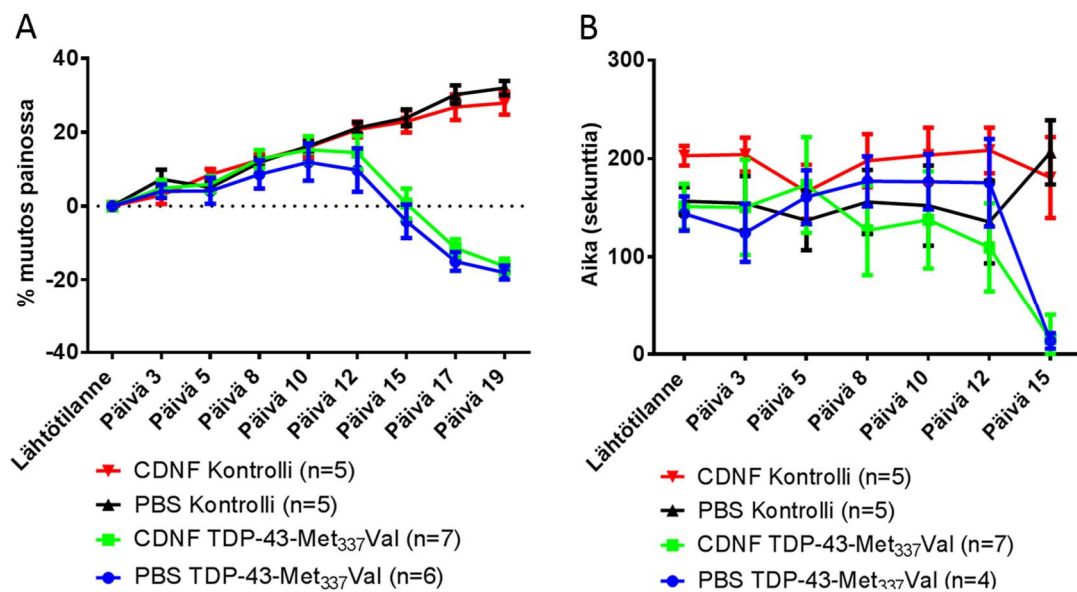
Kuva 8 A ja B. Takajaloille nouseminen yhden tunnin aikana pimeässä. A) Kymmenen päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen johtaa TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien (n=6) nousukertojen vähenemiseen kontrollirottiin (n=6) verrattuna. Kaksi päivää myöhemmin TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat eivät yleisesti otaen nouse takajaloilleen (Mauchlyn sfäärisyys testi: $\chi^2(9) = 18,10$, $p = 0,037$. Toistettujen mittausten ANOVA $F(4, 40) = 8,41$, **** $p = 0,0005$). B) Urosten takajaloille nouseminen yhden tunnin aikana pimeässä. TDP-43-Met₃₃₇Val-urosten (n=5) vähentynyt takajaloille nouseminen, verrattuna kontrolliuroksiin (n=3), on vähentynyt kaksitoista päivää doksisykliinin poistamisen jälkeen (Mauchlyn sfäärisyys testi: $\chi^2(9) = 9,96$, $p = 0,386$. Toistettujen mittausten ANOVA Greenhouse-Geisser korjauksella $F(2,43, 14,57) = 6,94$, ** $p = 0,006$). Kuvattuna keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet.



Kuva 9. TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta jonka silmäkulmaan on kuivunut vähän purppuraa.

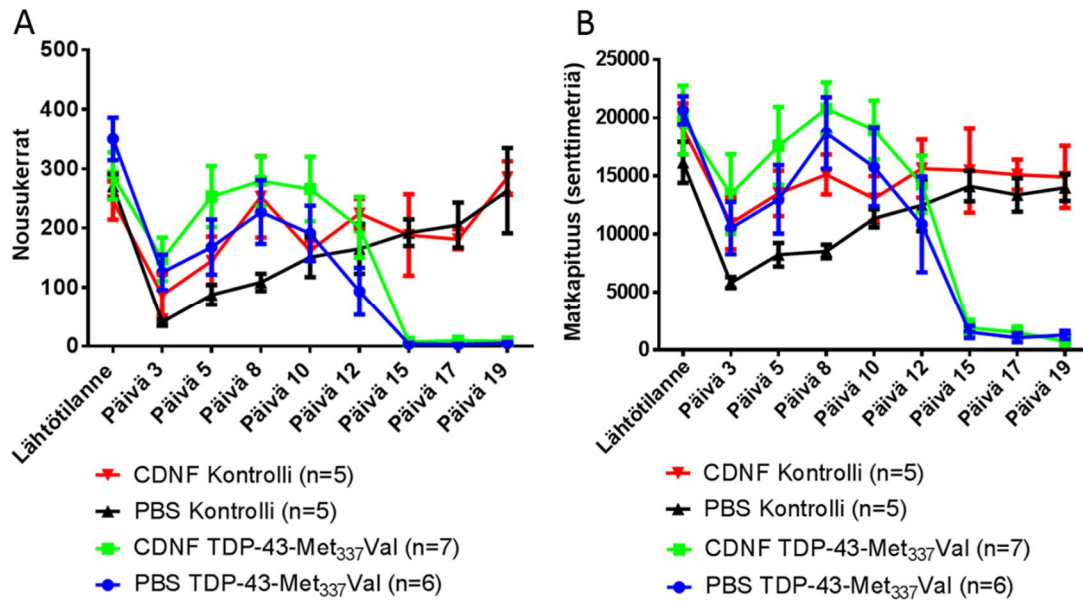
5.3 CDNF:n krooninen infuusio aivokammioon ja sen vaikutus oireiden esiintymiseen

TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat, jotka saivat CDNF:ää (n=7) tai PBS:ää (n=6), eivät osoittaneet keskenään eroja painon muutoksessa mittausten aikana. Painon laskeminen oli havaittavissa kaksitoista päivää doksisykliinin poistamisesta juomavedestä (Kuva 10 A). CDNF:ää saaneista TDP-43-Met₃₃₇Val-rotista, uroksia oli neljä ja naaraista kolme. PBS:ää saaneista TDP-43-Met₃₃₇Val-rotista uroksia oli aluksi neljä ja naaraista kolme. Yksi naaraista poistettiin tilastollisista analyyseistä koska se suoriutui kahdentenatoista päivänä tilastollisesti paremmin pyörivä sauva -kokeesta, ja lokomotoriikkaa mittaavissa kokeissa. CDNF:ää saaneet kontrollirotat (n=5), tai PBS:ää saaneet kontrollirotat (n=5) keräsivät painoa koko seurantajakson aikana (Kuva 10 A).



Kuva 10 A ja B. Muutokset painossa ja pyörivä sauva -kokeessa. A) CDNF:n vaikutus painoon siirtogeenisillä rotilla. CDNF:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (n=7) tai PBS:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (n=6) eivät eroa painon muutoksessa. CDNF:ää saaneet kontrollirotat (n=5) tai PBS:ää saaneet kontrollirotat (n=5) keräsivät painoa koko jakson ajan. B) CDNF:n vaikutus pyörivä sauva -kokeessa. CDNF:ää saaneiden TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien (n=7) ja PBS:ää saaneiden TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien (n=4) välillä ei esiintynyt merkittäviä eroja pyörivällä sauvalla. Ensimmäinen päivä oireiden ilmenemiselle on kaksitoista päivää siirtogeenin aktivoitumisesta. Kontrollirotat jotka saivat CDNF:ää (n=5), tai PBS:ää saaneet kontrollirotat (n=5), juoksivat hoidosta riippumatta joka päivä. Kuvattuna keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet.

Takajaloille nouseminen ja liikkuminen pimeässä ei osoittaneet eroja CDNF:ää tai PBS:ää saaneiden TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien välillä (Kuva 11 A ja B). Yleisesti ottaen, kaikilla TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla alkoi oireiden esiintymistä kymmenennen ja kahdennentoista mittauspäivän välillä. CDNF:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat suoriutuivat jopa heikommin kuin PBS:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat pyörivä sauva -kokeessa kahdeksannen mittauspäivän jälkeen. Kaksi PBS:ää saanutta TDP-43-Met₃₃₇Val-rottaa ei otettu huomioon pyörivä sauva -kokeen analyysiin koska ne vastustivat sauvalla juoksemista stereotaktisen leikkauksen jälkeen.



Kuva 11 A ja B. Takajaloille nouseminen ja liikkuminen pimeässä. A) CDNF:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (n=7) ja PBS:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (n=6) eivät käytä takaraajoja aktiivisesti 15 päivää siirtogeenin aktivoitumisesta. Kontrollirotat jotka saivat CDNF:ää (n=5), tai PBS:ää (n=5), nousivat hoidosta riippumatta joka päivä. B) CDNF:n vaikutus TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien liikkumiseen pimeässä. CDNF:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (n=6) ja PBS:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat (n=7) liikkuvat vähemmän 15 päivää siirtogeenin aktivoitumisesta. Kontrollirotat jotka saivat CDNF:ää (n=5), tai PBS:ää (n=5), liikkuvat tasaisesti jokaisena päivänä. Kuvattuna keskiarvot ja keskiarvon keskiarvo.

5.4 Vasta-ainevärjäykset

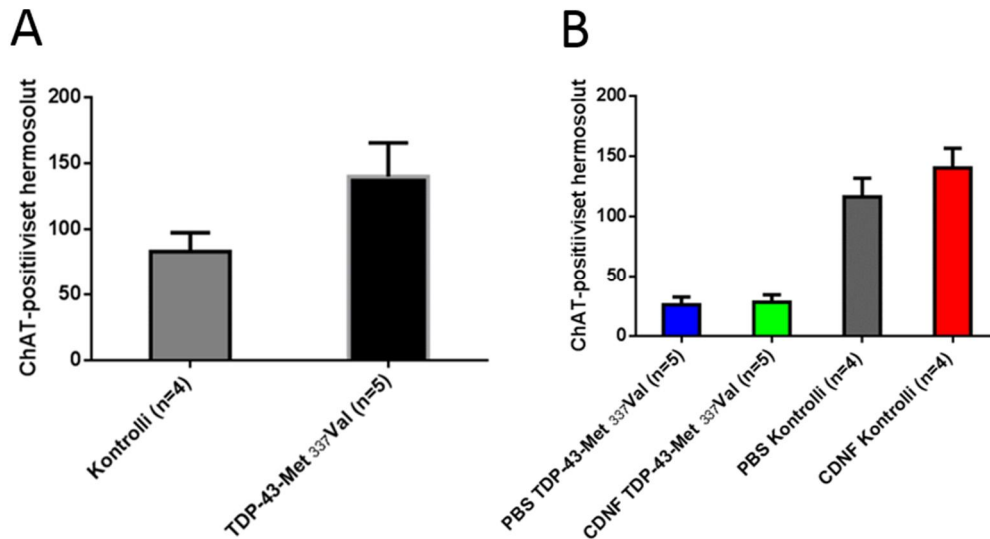
5.4.1 Koliiniasetyyli transferaasi vasta-ainevärjäys selkäydinleikkeille

Karakterisoinnissa käytetyillä TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla esiintyi odottamattomasti ChAT-positiivisia hermosoluja enemmän kuin kontrollirotilla (Kuva 12 A). ChAT-positiivisia hermosoluja esiintyi TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla keskimäärin yhteensä neljässä leikkeessä 140 kappaletta. Kontrollirotilla esiintyi puolestaan keskimäärin 80 ChAT-positiivista solua neljässä leikkeessä. Suurimmalla osalla kaikista rotista esiintyi yli 20 ChAT-positiivista solua leikettä kohden (Taulukko 3). Laskuista poistettiin kaksi kontrollirottia ja yksi TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta. Näiden yksilöiden selkäytimet olivat vahingoittuneet eikä molemmilta puolilta selkäydintä voinut laskea ChAT-positiivisia soluja.

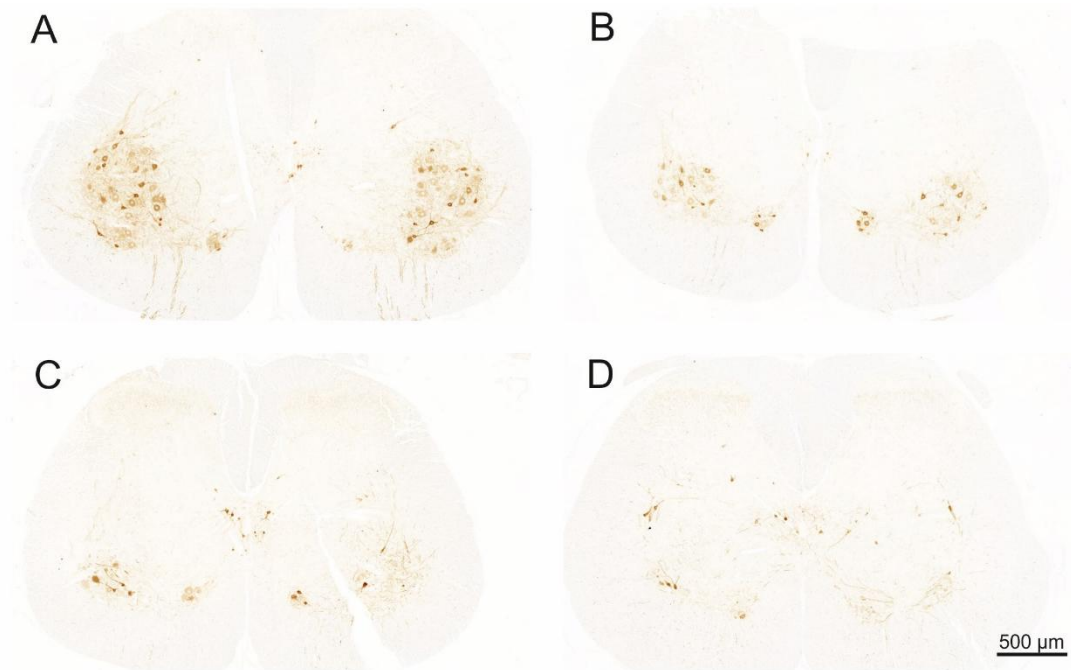
Taulukko 3. Karakterisoinnissa käytettyjen rottien ChAT-positiiviset hermosolut selkäytimen lumbaaliselältä alueelta. #: yksilöt.

	Leike 1	Leike 2	Leike 3	Leike 4	Summa	Soluja/ leike	Keskiarvon keskihajonta
<i>Kontrolli #1</i>	14	13	10	11	48	12	1,83
<i>Kontrolli #2</i>	19	19	20	19	77	19,25	0,5
<i>Kontrolli #3</i>	26	21	29	13	89	22,25	6,99
<i>Kontrolli #4</i>	30	26	27	35	118	29,5	4,04
<i>TDP-43-Met₃₃₇Val #1</i>	29	39	23	28	119	29,75	6,7
<i>TDP-43-Met₃₃₇Val #2</i>	38	42	42	38	160	40	2,31
<i>TDP-43-Met₃₃₇Val #3</i>	61	43	39	50	193	48,25	9,64
<i>TDP-43-Met₃₃₇Val #4</i>	7	13	7	23	50	12,5	7,55
<i>TDP-43-Met₃₃₇Val #5</i>	49	41	45	43	178	44,5	3,42

CDNF:ää tai PBS:ää saaneilla TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla esiintyi odotetusti huomattavasti vähemmän ChAT-positiivisia hermosoluja kuin kontrolliroilla (Kuva 13 A, B, C ja D). Näillä TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla esiintyi keskimäärin hieman yli 20 ChAT-positiivista hermosolua neljässä leikkeessä rottaa kohden. PBS:ää saaneilla kontrolliroilla esiintyi keskimäärin yhteensä 120 ChAT-positiivista hermosolua neljässä leikkeessä. CDFN:ää saaneilla kontrolliroilla esiintyi keskimäärin 140 ChAT-positiivista hermosolua neljässä leikkeessä. Värjäytymistä ei esiintynyt kudisleikkeissä, kun primaari tai sekundaari vasta-aine jätettiin pois (ei kuvaa).



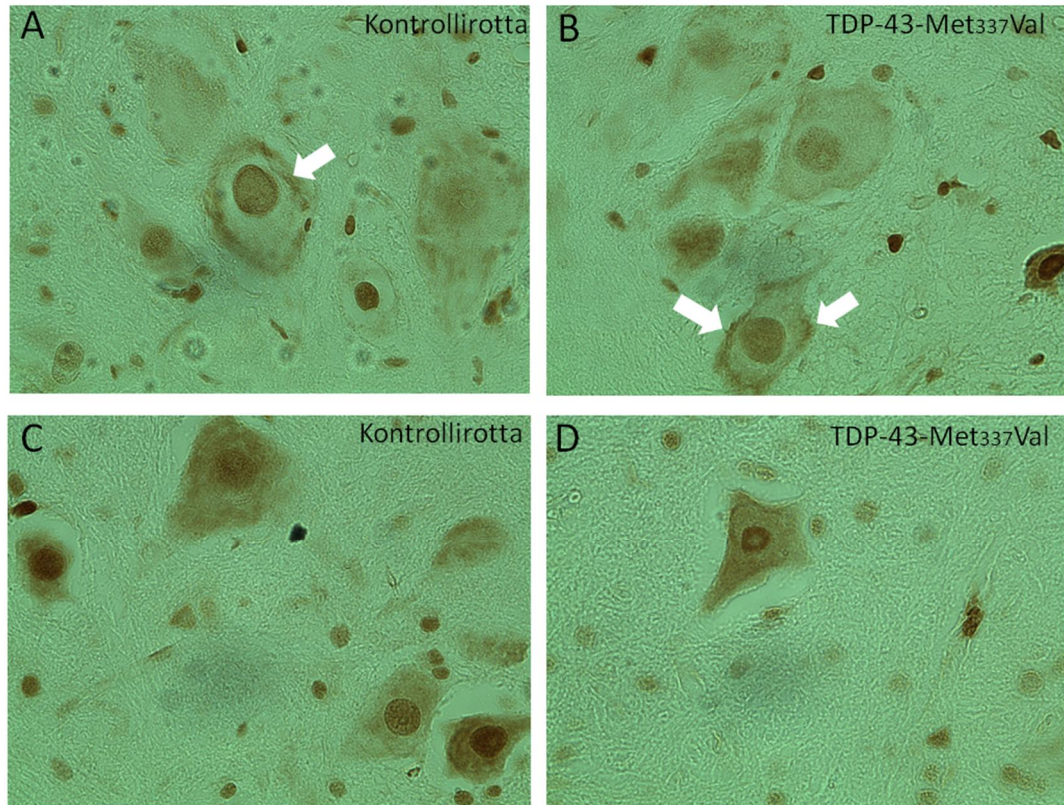
Kuva 12 A ja B. ChAT-positiiviset hermosolut. A) Karakterisointi osuuden kokeessa TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla esiintyy enemmän ChAT-positiivisia hermosoluja kuin kontrolliroilla. B) ChAT-positiiviset hermosolut rotilla eri käsittelyryhmissä. Esitettyinä ChAT-positiivisia hermosoluja laskettuna neljästä selkäydinleikkeestä per rotta ja keskiarvon keskivirhe.



Kuva 13 A, B, C ja D. ChAT-positiivisia hermosoluja TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien ja kontrollirottien selkäytimestä. A) Kontrollirotta joka on saanut PBS:ää. B) Kontrollirotta joka on saanut CDNF:ää. C) TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta joka on saanut PBS:ää. D) TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta joka on saanut CDNF:ää.

5.4.2 Stressijyvien vasta-ainevärijäys selkäydinleikkeille

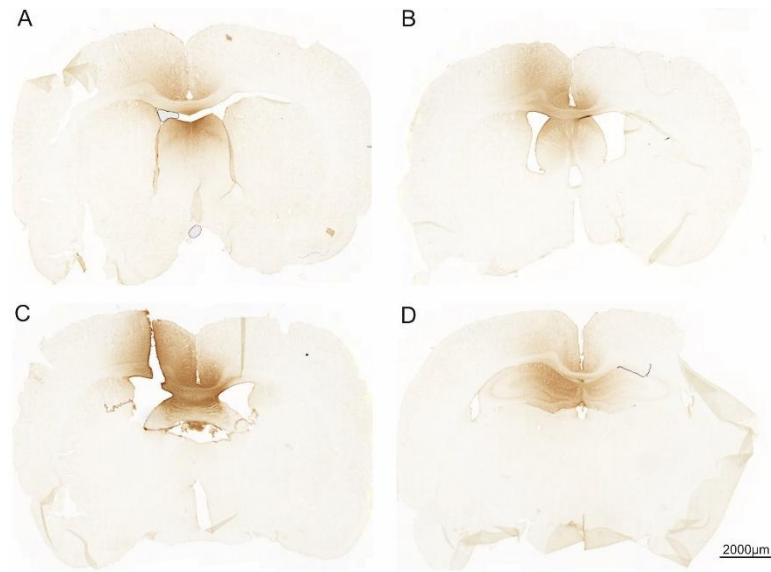
Selkäydinleikkeissä esiintyi TIA-1-värijäytymistä solutumissa niin harmaassa kuin valkoisessa aineessa. Harmaan aineen ventraalisessa pylväässä erottui isot hermosolut suurilla tumillaan, mutta myös solulima värjäytyi isoissa hermosoluissa (Kuva 14). Pistemäisiä esiintymiä tuman läheisyydessä, jotka olisivat viitanneet stressijyviin, ei esiintynyt kontrollirottien eikä TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien solulimassa. Yhdessä kontrollirotassa ja TDP-43-Met₃₃₇Val-rotassa esiintyi suurien hermosolujen periferiassa muista rotista poikkeavaa TIA-1:n lokalisoitumista (Kuvat 14 A ja B). Näissä soluissa ei esiintynyt tasaista värjäytymistä solulimassa. Primaari tai sekundaari vasta-aineen poisjättäminen ei aiheuttanut värjäytymistä (ei kuvaa).



Kuva 14 A, B, C ja D. TIA-1:n esiintyminen selkäytimen soluissa. A ja C) Kontrollirotissa esiintyvä TIA-1 lokalisoituu tumaan enemmän kuin solulimaan. B ja D) Myös TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla TIA-1 lokalisoituu tumaan enemmän kuin solulimaan. A ja B) Yhdessä kontrollirotassa ja yhdessä TDP-43-Met₃₃₇Val-rotassa oli havaittavissa suurien hermosolujen periferiassa TIA-1:tä, jota valkoiset nuolet osoittavat. Muualla solulimassa on TIA-1:tä vähemmän näissä soluissa.

5.4.3 CDNF:n vasta-ainevärjäys aivoleikkeille

CDNF:ää havaittiin rottien toisen aivopuoliskon aivokuorella, kuin myös aivokurkiaisien ventraalisella puolella (Kuva 15). CDNF oli diffundoitunut noin 3,5 millimetriä (mm) pituiselle alueelle laskettuna bregmasta. Yhdellä yksilöllä ei esiintynyt värjäytymistä ollenkaan.



Kuva 15 A, B, C ja D. CDNF:n diffundoituminen rotan aivoissa tarkasteltuna bregmasta. Esitettynä koronaalisia leikkeitä yhden rotan aivosta. A) 0,20 mm bregmasta. B) -0,4 mm bregmasta. C) -1,30 mm bregmasta. D) -3,30 mm bregmasta.

6 Tulosten tarkastelu ja pohdinta

6.1 Siirtogeenisten rottien karakterisointi

TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien oireet alkoivat kymmenen päivää doksisykliinin poistamisen myötä, kuten Huang (2012) työryhmineen aikaisemmin oli karakterisoinut. Jälkeläisten saaminen on vaikeata tälle siirtogeeniselle rottakannalle. Karakterisointi osuudessa käytettiin rottia kolmesta eri poikueesta. Painon lasku ja heikentyneet motoriset kyvyt ilmenevät nopeasti ja etenevät radikaalisti. Rotilla esiintyy myös tärinää. Kahden päivän sisällä ensioireiden ilmaantumisesta, rotat ovat heikentyneet huomattavasti, jonka jälkeen niiden liikkuminen on hyvin vähäistä. Purppuran erityy näillä rotilla onkin hyvin yleistä, ja suurimmalla osalla esiintyy enemmän tai vähemmän purppuraa. Huang (2012) työryhmineen eivät kuitenkaan raportoi tästä ilmiöstä.

Etukäpälien puristusvoiman mittauksilla ei todettu eroja TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien tai kontrollien välillä. Syy voi liittyä siihen, että kyseistä mittausta tehtiin kolmelle eri poikueelle ja mittausten tekijät eivät olleet samoja henkilöitä. Kaiken lisäksi rottien eturaajat heikkenevät myöhemmin kuin takaraajat. Rottien etukäpälien puristusvoiman mittaaminen ei kuitenkaan tunnu olevan luontevaa rotalle, vaan hyvinkin epämiellyttävä kokemus. Huang (2012) työryhmineen mittasi takakäpälien puristusvoimaa, jonka avulla he osoittivat julkaisussaan takaraajojen heikentymistä. Tässä lopputyössä laskettiin takajaloille nousua, joka määräkohtaisesti laski radikaalisti.

Ihmisissä esiintyvä ALS ei muistuta TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien äkillisesti alkavia oireita. Äkillinen oireiden esiintyminen ja pahentuminen, ei ole fysiologisesti verrattavissa ALS-potilaisiin. TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien äkillinen terveydentilan heikentyminen herättää kysymyksen, johtuuko se varsinaisesti liikehermosolu kadosta. Jotkin TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat jouduttiin karakterisointi osuudessa lopettamaan aikaisemmin kuin toiset, koska niiden terveydentila heikkeni nopeasti. Siitä huolimatta ChAT-positiivisia hermosoluja ei esiintynyt vähemmän verratuna kontrollirottiin. Alkuoireet jotka esiintyvät TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla eivät todennäköisesti johdu

liikehermosolukadosta. On mahdollista, että ChAT-positiiviset (liike)hermosolut menettävät ensin yhteyden lihaksiin. Itse liikehermosolun ohjelmoitu solukuolema tapahtuu myöhemmin, kunnes sairaus etenee tarpeeksi kauan. Esimerkiksi Fischer (2004) tutkimusryhmineen raportoivat ALS potilaasta, jonka lihakset olivat surkastuneet, mutta selkäytimen suurten (liike)hermosolujen somat olivat vahingoittumattomia. Myös SOD1-hiirimallissa on huomattu liikehermosolujen menettävän yhteyden luurankolihaan sairauden alkuvaiheessa (Fischer ym. 2004). Tämän takia voi spekuloida, että ALS:issa liikehermosolut menettävät ensin yhteyden luurankolihaan.

Liikehermosolut eivät ole ominaisuuksiltaan identtisiä, vaan ne luokitellaan kolmeen eri luokkaan, riippuen minkälaisia lihassyitä ne hermottavat (Burke ym. 1973). Ensimmäinen liikehermosoluryhmä hermottaa lihassyitä, jotka kykenevät suureen voiman tuottoon, joka on tehokasta mutta lyhytaikaista. Toinen liikehermosoluryhmä hermottaa lihassyitä, jotka pystyvät tuottamaan suuria voimia pitkäaikaisesti. Kolmas ryhmä koostuu liikehermosoluista jotka hermottavat pieniä voimia tuottavia lihassyitä, mutta ovat hyvin pitkäjänteisiä (Burke ym. 1973).

SOD1-hiirillä tai TDP-43-hiirillä, jotka ilmentävät mut*TARDBP*:ta, jonka TDP-43:n NLS on mutatoitunut, esiintyy ilmiö, jossa suuria voimia tuottavien lihaksien liikehermosolut kuolevat ensin (Kaplan ym. 2014; Spiller ym. 2016). Liikehermosoluja vaarantavaksi tekijäksi, on ehdotettu proteiinia, joka pilkkoo solun ulkopuolista matriksia (MMP-9: engl. Matrix Metalloproteinase 9). MMP-9:ää ei ilmene liikehermosoluissa, jotka ovat kaikista vastustuskykyisimpiä edellä mainituissa ALS-hiirimalleissa (Kaplan ym. 2014; Spiller ym. 2016).

6.2 CDNF:n vaikutus TDP-43-Met₃₃₇Val-rottiin

CDNF:ää tai PBS:ää saaneiden TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien välille ei syntynyt merkittäviä eroja. Tähän kokeeseen käytettiin kahden eri poikueen rottia. Molemmissa ryhmissä oli suurin osa uroksia. Aloituspainot olivat pienemmät näillä rotilla kuin

karakterisoinnissa käytettyjen rottien painot. Pyörivä sauva -kokeista jouduttiin poistamaan pari CDNF:ää saanutta TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta yksilöä niiden haluttomuuden takia. Nämä rotat lopettivat juoksemisen pyörivällä sauvalla stereotaktisten leikkausten jälkeen. Kahdeksantena päivänä pyörivä sauva -kokeessa näytti CDNF:ää saaneiden TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien jopa suoriutuvan heikommin, kuin PBS:ää saaneet TDP-43-Met₃₃₇Val-rotat.

Yksi PBS:ää saanut TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta poistettiin myös analyyseistä, koska oireet alkoivat esiintymään myöhemmin kuin muilla TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla. Tämä voi viitata siihen, että mut*TARDBP*:n ilmentyminen ei ole alkanut tällä rotalla samalla tavalla kuin muilla rotilla. Rotilla voi myös olla yksilöllisiä eroja sietää yli-ilmentyvän mutatoituneen mut*TARDBP*:n aiheuttamaa patofysiologiaa. Kvantitatiivista määrittystä mutatoituneen TDP-43:n esiintymisen suhteen ei kuitenkaan tehty tässä lopputyössä.

CDNF:ää ja PBS:ää saaneiden TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien keskuudessa alkoi oireet keskimäärin kaksi päivää myöhemmin kuin karakterisoinnissa. Tämä herättää kysymyksen, voiko jopa aivokammioon annettu PBS vaikuttaa oireiden esiintymiseen. CDNF oli liuotettu PBS:ään. mut*TARDBP*:n ilmentymistä hypotalamuksessa ei voi laskea pois TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla. Huang (2012) työryhmineen ei tutkinut artikkelissaan mutatoituneen TDP-43:n esiintymistä aivoissa. Aivojen hypotalamuksessa esiintyy myös kolinergisia hermosoluja (Rao ym. 1987). Tämän takia voi olla mahdollista, että mutatoitunut TDP-43 vaikuttaa myös aivojen kautta oireiluun.

6.3 Koliiniasetyylitransferaasi positiiviset hermosolut

Tässä lopputyössä lasketut ChAT-positiiviset hermosolut laskettiin manuaalisesti eikä soluja eritelty kokoluokan mukaan. Kaikki ChAT-positiiviset hermosolut eivät ole välttämättä liikehermosoluja. Tässä tutkimuksessa oli havaittavissa intensiivisesti värjäytyviä ChAT-positiivisia hermosoluja ja vähemmän intensiivisesti värjäytyviä ChAT-positiivisia hermosoluja. Intensiivisesti värjäytyneet hermosolut olivat kokoluokaltaan pienempiä kuin vähemmän värjäytyneet ChAT-positiiviset hermosolut.

Barber (1984) työryhmineen on myös aikaisemmin kuvaillut eroja ChAT-positiivisten hermosolujen värjäytymisessä niiden fenotyypin mukaan rotan selkäytimessä.

Yksi selitys eri intensiteetillä värjäytyville ChAT-positiivisille hermosoluille tässä värjäyksessä, voi johtua leikkeiden paksuudesta. Koska liikehermosolut ovat suuria, läpimitaltaan yli 25 mikrometriä, ei koko solua saada yhdelle leikkeelle, vaan useammalle leikkeelle. Vain osa solulimassa esiintyvälle ChAT:lle on mahdollisesti tunnistettu värjäyksissä. Liikehermosolujen koon takia, suoritettiin värjäys 30 mikrometrin välimatkoina. Värjäyksissä esiintyi kuitenkin paljon ChAT-positiivisia hermosoluja, jotka olivat läpimitaltaan 50 mikrometriä tai jopa suurempia. Tämän takia ei voi sulkea pois sitä mahdollisuutta, että jotkin hermosolut on mahdollisesti laskettu kahteen otteeseen.

ChAT-positiivisten hermosolujen määrä karakterisoinnissa käytettyjen TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien ja kontrollirottien välillä oli odottamaton tulos. TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla oli enemmän ChAT-positiivisia hermosoluja verrattuna kontrollirottiin. TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien paino ja lokomotoriikka kuitenkin laski käyttäytymiskokeissa. CDNF:ää tai PBS:ää saaneiden TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien ChAT-positiivisten hermosolujen määrä oli pienempi verrattuna kontrollirottiin. Tämä tulos oli looginen käyttäytymiskokeissa saatujen tulosten valossa. Karakterisointiosuuden neljällä TDP-43-Met₃₃₇Val-rotalla esiintyi keskimäärin yhtä paljon, ja hieman enemmänkin, ChAT-positiivisia hermosoluja, kuin CDNF:ää tai PBS:ää saaneilla kontrollirotille. Karakterisointiosuuden kahdella TDP-43-Met₃₃₇Val-rotalla esiintyi keskimäärin saman verran ChAT-positiivisia hermosoluja, kuin CDNF:ää tai PBS:ää saaneilla TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla.

Mahdollinen selitys karakterisointiosuuden tuloksille voi johtua TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien aikaisemmasta lopettamisesta. Nämä rotat eivät ehkä saavuttaneet samaa päätepistettä kuin CDNF:ää ja PBS:ää saaneet rotat. CDNF:ää tai PBS:ää saaneista TDP-43-Met₃₃₇Val-rotista suurin osa oli menettänyt vähintään 40 %:a aloituspainostaan ennen kuin ne lopetettiin. Huangin (2012) työryhmineen julkaisemassa artikkelissa oli yksi päätepisteen kriteereistä 30 %:n menetys aloituspainosta. He laskivat selkäytimen lumbaalisen kolmannen ja viidennen selkänikaman alueelta epäspesifisellä tavalla, ja

suuremmalla määrällä selkäydinleikkeitä. Suuret liikehermosolut vähentyivät määrällisesti melkein kahdella kolmasosalla (Huang ym. 2012).

mut*TARDBP*:n yli-ilmentämisen suorat vaikutukset ChAT:n esiintymiseen ovat tuntemattomat tässä ALS-rottamallissa. Polymenidou (2011) työryhmineen huomasi, että hiiren *ChAT*:n ilmentyminen väheni hiirillä, kun *Tardbp*:n ilmentymistä estettiin transkriptionaalisella tasolla. Tämä tarkoittaa periaatteessa sitä, että TDP-43:n fysiologinen toiminta estyy TDP-43-Met₃₃₇Val-rottien hermosoluissa. Tämä vastaisi tilannetta joka esiintyy esimerkiksi hiirellä, kun *Tardbp*:n ilmentyminen estetään transkriptionaalisella tasolla.

6.4 Stressijyvien värjäys

Tässä lopputyössä ei huomattu TIA-1-värjäyksissä stressijyviä solutumien ulkopuolella. Met₃₃₇Val-mutaatiota kantavat TDP-43:t ei ole todettu muodostavan spontaanisti stressijyviä *in vitro*, vaan tarvitsevat oksidatiivista tai lämmön aiheuttamaa stressiä (Bentmann ym. 2012). Myöskään muiden ALS:iin liitettyjen TDP-43 mutaatioiden ei ole todettu johtavan spontaaniin stressijyvien muodostumiseen *in vitro* (Barmada ym. 2010). Liu-Yesucevitz (2010) tutkimusryhmineen osoittivat TIA-1-positiivisten stressijyvien kolokalisoituvan TDP-43:n kanssa sALS-potilaiden selkäytimissä suurissa (liike)hermosoluissa. Bentmann (2012) työryhmineen osoitti vastaavasti toisella stressijyvä proteiinilla saman tuloksen. Stressijyviä ei kuitenkaan esiinny kaikissa suurissa (liike)hermosoluissa. Kirjallisuudesta ei löydy immunohistokemiallisia tutkimuksia stressijyvistä fALS-potilailla, tai siirtogeenisillä hiirillä tai rotilla, joilla on Met₃₃₇Val-mutaatio TDP-43:ssa.

Vaikka tässä lopputyössä ei pystytty löytämään stressijyviä TIA-1-värjäyksellä, voi stressijyviä yrittää havaita muilla stressijyvä proteiineilla. Värjäyksiä tehtiin ainoastaan karakterisoinnissa käytetyille rottien selkäydinkudoksille ja villityypin rotan selkäydinkudokselle. Liikehermosolukato ei saisi olla liian suuri, jotta liikehermosoluja voidaan tutkia stressijyvien varalta. Toisaalta, ALS:n kaltaisessa sairaudessa olettaisi

myös muiden hermosolujen ja glia-solujen kärsivän, kuin vain liikehermosolujen. Koska stressijyviin liittyvä kirjallisuus perustuu pitkälti *in vitro* kokeista, on vaikeata verrata tämän työn löydöksiä kirjallisuudessa esiintyviin löydöksiin. Konfokaalimikroskopian avulla on kuitenkin ALS-potilaiden selkäydinleikkeissä pystytty löytämään stressijyviä joissakin tutkimuksissa, joissa kaiken lisäksi esiintyy TDP-43:a (Liu-Yesucevitz ym. 2010; Bentmann ym. 2012).

TIA-1:llä ja TDP-43:lla voi olla yhteys ALS:ssä. Pistemutaatio TIA-1:ssä aiheuttaa Welanderin tautia, jossa raajojen lihakset surkastuvat, mikäli potilas on homotsygootti tämän geenin suhteen (Hackman ym. 2013). Pistemutaatiot TIA-1:ssä on myös hiljattain todettu aiheuttavan harvinaisissa tapauksissa fALS:ia, mutta kyseiset pistemutaatiot eivät esiinny samassa kohtaa TIA-1:ssä, kuten Welanderin tautia sairastavilla henkilöillä (Mackenzie ym. 2017). Selkäydinkudoksissa ei kuitenkaan esiinny näillä fALS-potilailla kolokalisaatiota TIA-1:n ja TDP-43:n kanssa stressijyvissä. Sitä vastoin, Welanderin tautia sairastavien potilaiden lihasnäytteissä voi paikoitellen nähdä atrofioituneissa lihassyissä osittain kolokalisaatiota TDP-43:n kanssa (Hackman ym. 2013).

TIA-1:n lokalisoituminen suurten hermosolujen soluliman periferiaan yhdessä kontrollirotassa ja yhdessä TDP-43-Met₃₃₇Val-rotassa poikkesi muista yksilöistä. Löydöksestä on vaikeata tehdä päätelmiä. Ilmiö voi mahdollisesti liittyä poikkeavaan perfusointiin ja fiksaukseen. Mikäli ilmiö liittyy siirtogeeneihin joita nämä rotat kantavat, ja mikäli ilmiö voi satunnaisesti toistua tässä ALS-rottamallissa, olisi syytä tutkia tämän merkitystä. Tämän lisäksi, tässä tutkimuksessa ei myöskään kokeiltu voiko esimerkiksi indusoida stressijyvien esiintymistä villityypin rotilla, esimerkiksi antamalla selkäyttimeen kemiallista yhdistettä, joka aiheuttaa stressijyvien muodostumista. Tämä olisi tarpeellista, jotta pystyttäisiin tunnistamaan stressijyviä rottien selkäydinleikkeissä, ja näin ollen, käyttää niitä niin kutsuttuina positiivisina kontrolleina TIA-1-värjäyksissä.

6.5 CDNF:n diffuusiokoe

Tässä lopputyössä pystyttiin havaitsemaan humaania rekombinanttia CDNF:ää aivokuorella, ja vain toisella aivopuoliskolla. Ilmiö selittyy todennäköisesti sillä, että näihin yksilöihin kanyylin pää on jäänyt aivokuorelle, eikä päätynyt aivokammioon. Yhdessä yksilössä ei pystytty havaitsemaan CDNF:ää. Tämä voi mahdollisesti johtua siitä että CDNF:ää ei ole diffundoitunut ympäröivään aivokudokseen. Toinen mahdollinen selitys on, että tämä rotta on saanut kanyyliin aivokammioon, mutta vapautunut CDNF ei ole diffundoitunut ympäröivään aivokudokseen. Vuorokaudessa vapautunut kokonais CDNF-annos oli kolme mikrogrammaa tässä tutkimuksessa. Kymmenen mikrogramman CDNF-kerta-annos aivokammioon SOD1-hiirille, on osoittanut diffundoituvan selkäyttimeen ja lihaksistoon (Hella, lopputyö 2014). Aivojuovioon annettu kymmenen mikrogramman CDNF-annos leviää aivoihin niin rotalla kuin apinalla (Voutilainen ym. 2011; Garea-Rodríguez ym. 2016). Tässä lopputyössä käytettyjen kanyylien arvioitu penetraatio syvyys kallon ulkopuolelta on yhdestä kolmeen millimetriä (Alzet). Käyttämällä pidempiä kanyylejä tai jättämällä levikepalat pois, voi penetraatio syvyyttä lisätä.

6.6 TDP-43-patologian hoito amyotrofisessa lateraaliskleroosissa

Tätä lopputyötä tehdessä, hyväksyi Yhdysvaltojen ruoka- ja lääkeviranomaiset eradavonen (Radicava®) ALS:in hoitoon (U.S. Food and Drug Administration). Radicava® on vasta toinen hyväksytty lääke ALS:in hoitoon. Rilutek® oli ensimmäinen hyväksytty lääke ALS:n hoitoon, ja sen käyttöönotosta on kulunut jo yli 20 vuotta. Alkuperäisen tutkimuksen mukaan, rilutsoli (vaikuttava aine Rilutek®:issa) pidentää odotettua elinikää kolmella kuukaudella bulbaarista muotoa sairastavilla ALS-potilailla (Bensimon ym. 1994). Edellä mainitut lääkkeet vaikuttavat reaktiivisten happiradikaalien vähentämiseen tai glutamatergiseen eksitotoksisuuteen.

Uusille lääkkeille ja hoitomuodoille on suuri tarve ALS:in hoidossa. Koska aikaisemmat tutkimukset CDNF:llä on osoittanut positiivisia vaikutuksia eläinkokeissa, on perusteltua jatkaa tutkimuksia CDNF:llä.

Ehkä suurin epäkohta tässä lopputyössä käytetyssä ALS-eläinmallissa, ja kaikissa TDP-43-eläinmalleissa, on se, että liitetty *TARDBP* on cDNA:ta, jonka takia *TARDBP*:n lähetti-RNA ei sisällä 3'UTR:ää. TDP-43 säätelee kuitenkin fysiologisesti *TARDBP*-lähetti-RNA:n 3'UTR:än kautta omaa ilmentymistään (Ayala ym. 2011; Polymenidou ym. 2011). Tämän lisäksi on syytä muistaa, että mut*TARDBP* on pyritty saada ilmentymään vain (liike)hermosoluihin (Huang ym. 2012). Henkilöt jotka sairastavat fALS:ia johtuen mut*TARDBP*:stä, kantavat mut*TARDBP*:tä elimistön jokaisessa solussa. Suurin osa ALS-potilaista sairastavat sitä paitsi sALS-muotoa, joten TDP-43-patologiaa ei pidä yhdistää yksistään mutatoituneisiin TDP-43 muotoihin. Tietävästi kukaan ei ole osoittanut että TDP-43-patologia olisi syy, jonka takia hermosolut kuolevat pois ALS:issa. Kaiken lisäksi, pienellä osalla ALS-potilaista ei esiinny TDP-43-patologiaa (Mackenzie ym. 2007; Tan ym. 2007). Yksi teoria TDP-43-patologian aiheuttamista vaikutuksista, on aggregoituneiden TDP-43:en toimivan sieninä, jotka imevät itseensä solun TDP-43:a. Tämä puolestaan johtaa TDP-43:n puutteeseen tumassa ja solulimassa, mikä johtaa omalta osaltaan muutoksiin geenien ilmentymiseen transkriptionaalisella tasolla.

6.7 CDNF:n tutkiminen tulevaisuudessa TDP-43-rotilla ja muilla amyotrofisen lateraaliskleroosin tautimalleilla

CDNF:n krooninen annostelu aivokammioon ei hidastanut eikä estänyt oireiden esiintymistä TDP-43-Met₃₃₇Val-rotilla. Kanyyli ei todennäköisesti penetroitunut aivokammioon, vaan jäi aivokuoreen. CDNF:n tutkimista näillä rotilla kannattaa yrittää uudelleen, mikäli kanyylille löydetään sopiva syvyys. Myös CDNF:n annoksen nostoa pitäisi harkita, sekä kokeet joissa annetaan CDNF:ää yhdessä muiden hermokasvutekijöiden kanssa, voisi olla potentimpi vaihtoehto, kuin CDNF yksinään. Vastaisuudessa kannattaa myös seurata TDP-43:n esiintymistä selkäytimessä ja aivoissa

näillä rotilla, jonka avulla voisi kvantitatiivisesti yrittää määrittää TDP-43:n esiintymistä.

CDNF:n vaikutusta C-terminaalisten fragmenttien muodostumiseen voisi myös tutkia. CDNF on *in vitro* osoittautunut vähentävän fosforyloituneen alfa-synykleiinin määrää (Julkaisematon havainto, Panhelainen A, 2017). TDP-43:n ja C-terminaalisten fragmenttien fosforylointia voisi myös tutkia näillä rotilla, tai vastaavanlaisilla TDP-43-hiirillä. *mutTARDBP*:n ilmentämistä voisi myös yrittää hallita doksisykliiniä antamalla sitä vähemmän TDP-43-Met₃₃₇Val-rotille.

Serebraalinen dopamiinisolujen hermokasvutekijän -fragmentti josta puuttuu N-terminaalinen osa (C-CDNF) on myös tutkimuksen alla. C-CDNF on yhtä potentti vaikutuksiltaan kuin täysipitkä CDNF (Julkaisematon havainto, Saarma Laboratorio). C-CDNF:n injisoiminen lihaksistoon olisi myös yksi vaihtoehto tutkia tämän hermokasvutekijän vaikutusta liikehermosolujen eloonjäämiseen. Tämän tyyppinen koe pitäisi aloittaa ensimmäisten oireiden esiintyessä, ja valita sopiva(t) lihakset joihin injisoida hermokasvutekijää tai sen fragmenttia. Mikäli liikehermosolujen kuolema alkaa hermo-lihasliitosten tuhosta, pitää hermokasvutekijöitä antaa aikaisessa vaiheessa, ennen kuin liian suuri osa hermo-lihasliitoksista menetetään. Liikehermosolut, jotka hermottavat lihassyitä, jotka tuottavat suuria voimia, olisi varteenotettava vaihtoehto hermokasvutekijöiden injisoimiselle.

Lihakseen injisoitu hermokasvutekijä olisi loogista, koska CDNF esiintyy fysiologisestikin normaalisti lihaskudoksessa (Lindholm ym. 2007). Periferian kautta tapahtuvia vaikutusmekanismeja voisi myös tutkia samanaikaisesti. Olisi myös mielenkiintoista tutkia, jos C-CDNF voisi kulkeutua retrogradisesti liikehermosolujen aksonia pitkin solutumaan. Tämän takia lihaksiin annettava C-CDNF pitäisi antaa hyvissä ajoin ennen kuin lihasten surkastuminen on edennyt liian pitkälle, ja hermo-lihasliitokset on menetetty. Retrogradisesti aksonia pitkin kulkeutuvan yhdisteen avulla (kuten esimerkiksi metyyliisini tai koleratoksiini) joka leimaa kuljetun reitin, mahdollistaisi tämän tutkimisen. Edellä mainitun avulla voisi tutkia, voiko C-CDNF esiintyä värjäytyneissä aksoneissa, tai peräti selkäytimen liikehermosolujen somassa.

ALS-hiirimallit ja rottamallit, jotka ilmentävät toista mutatoitunutta muotoa *TARDBP*:sta, tai pelkästään villityypiä, voisi olla hyvä tutkia. Valitettavasti kaikki TDP-43-rottamallit ilmentävät vain mutatoitunutta muotoa, ja sitäkin hyvin paljon (Huang ym. 2012; Tong ym. 2012; Tong ym. 2013). TDP-43-hiiristä löytyy huomattavasti laajempi repertuaari.

Myös CDNF:n vaikutuksia muissa ALS:n ja jopa FTLD:n liittyvissä eläinmalleissa voisi tutkia. Yhdeksännen kromosomin avoimen lukukehyksen 72:n, ensimmäisessä intronissa esiintyvä heksanukleotidi -monistuma, on yleisin geenimutaatio fALS-tapausten parissa (DeJesus-Hernandez ym. 2011; Renton ym. 2011). Kyseinen geenimutaatio selittää puolestaan neljännesosan suvussa esiintyvistä FTLD:stä (Majounie ym. 2012). Myös FTLD-U-potilailla esiintyy TDP-43-patologiaa (Arai ym. 2006; Neumann ym. 2006).

CDNF:n tai C-CDNF:n vaikutuksia niiden geenien ilmentymiseen, joihin TDP-43 osallistuu transkriptionaalisella tasolla, voisi myös tutkia tulevaisuudessa. Olisi esimerkiksi mielenkiintoista vertailla muutoksia niiden geenien lähetti-RNA:n ilmentymisessä, joihin TDP-43 osallistuu, ja verrata kuinka CDNF tai C-CDNF vaikuttaa niiden ilmentymiseen. TDP-43:n poissa-olo heijastuu solujen transkripti profiiliin, mikä mahdollisesti on osa ALS-patofysiologia. Näin ollen, jos CDNF:n tai C-CDNF:n tahdotaan auttavan ALS-potilaita, joilla esiintyy TDP-43-patologiaa, olisi loogisesti ajateltuna tämän hermokasvutekijän pystyttävä normalisoimaan muuttunut transkripti profiili.

7 Yhteenveto ja johtopäätökset

TDP-43 on RNA:ta sitova proteiini ja sen on osoitettu osallistuvan geenien ilmentymiseen transkriptionaalisella tasolla. Se lokalisoituu pääasiassa tumaan, jossa se osallistuu prekursori-lähetti-RNA:n ja lähetti-RNA:n prosessointiin. TDP-43:n

puuttuminen/ toiminnan esto soluissa, johtaa vääjäämättä muutoksiin geenien ilmentymisessä. Mutaatiot *TARDBP*:ssa voi johtaa ALS:iin, mutta mutaatiot ovat harvinaisia. *In vitro* kokeiden avulla on huomattu, kuinka muutoksia tapahtuu solujen homeostaasissa, kun ne yli-ilmentävät mut*TARDBP*:ta tai villityypin *TARDBP*:ta.

Suurimmalla osalla ALS-potilaista voidaan havaita hermosolujen ja glia-solujen solulimassa sulkeumia, joissa esiintyy TDP-43:a. Samalla on tuman sisäinen TDP-43 poistunut kyseisissä soluissa. Myös tuman sisälle on voinut muodostua satunnaisesti sulkeumia. Ilmiötä kutsutaan TDP-43-patologiaksi ja sitä esiintyy aivoissa ja selkäytimessä. TDP-43:a esiintyy myös aggregoituneena ja fragmentoituneena ALS-potilailla. Monia erilaisia siirtogeenisiä hiiren ja rotan ALS-eläinmalleja, jotka kantavat perimässään mut*TARDBP*:ta tai villityypin *TARDBP*:ta, on luotu vuosien varrella. Useimmille eläinmalleille muodostuu ALS:ia muistuttava patofysiologia.

Tässä lopputyössä karakterisoitiin TDP-43-Met₃₃₇Val-rotta, joka kantaa perimässään ihmisen mut*TARDBP*:ta. Näillä rotilla esiintyi painonlaskua ja lokomotoriikan heikkenemistä kymmenen päivää mut*TARDBP*:n aktivoitumisen jälkeen. Tämän jälkeen oireet pahentuvat ja etenevät nopeasti. Krooninen infuusio CDNF:ää rottien aivokammioon kahden viikon aikana ei estänyt eikä hidastanut oireiden esiintymistä. Tämä voi johtua aivoihin pistetyn kanyylin liian matalasta penetraatiosta, tai liian pienestä CDNF-vuorokasiannoksesta. Toisaalta, tässä lopputyössä käytetty ALS-rottamalli, on todennäköisesti liian aggressiivisesti etenevä tautimalli. ALS-jyrsijämalli joka ilmentää patologista siirtogeeniä muissakin soluissa, kuin ainoastaan liikehermosoluissa, olisi myös realistisempi malli.

ChAT-positiivisten hermosolujen määrä selkäytimessä ei laske, mikäli oireiden ei anneta jatkua tarpeeksi kauan. Tämä voi viitata siihen, että näiden rottien alkuoireet johtuvat aluksi hermo-lihasliitosten menettämisestä, tai jostakin muusta tuntemattomasta tekijästä.

Stressijyviin viittavia löydöksiä ei tehty, mutta se ei tarkoita, etteikö niitä mahdollisesti muodostu. Oikean ajankohdan valitseminen ja sopivat vasta-aineet, joiden avulla voidaan havaita stressijyviä, pitäisi ensin löytää, jotta stressijyvien mahdollinen

havaitseminen onnistuisi. CDNF:n vaikutusta stressijyvien esiintymiseen voisi myös tutkia *in vitro* kokeilla.

CDNF:n vaikutuksia kannattaa tutkia vastaisuudessa vähemmän aggressiivisella ALS-eläinmallilla, joka muistuttaa enemmän ihmisten ALS:ia. ALS-eläinmallit jotka eivät ilmennä mut*TARDBP*:ta olisivat mielenkiintoisia vaihtoehtoja jatkotutkimuksia ajatellen.

Kirjallisuusluettelo

Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, Kwak S: TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* 120: 75–84, 2010

Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SS, Kiskinis E, Winborn B, Freibaum BD, Kanagaraj A, Clare AJ, Badders NM, Bilican B, Chaum E, Chandran S, Shaw CE, Eggan KC, Maniatis T, Taylor JP: Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 81: 536–543, 2014

Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chio A, Rix-Brooks B, van den Berg LH: Amyotrophic lateral sclerosis: Moving towards a new classification system. *Lancet Neurol* 15: 1182–1194, 2016

Alzet (Viitattu 10.8.2017). Saatavissa internetissä:
http://www.alzet.com/products/brain_infusion_kit/index.html

Amador-Ortiz C, Lin WL, Ahmed Z, Personett D, Davies P, Duara R, Graff-Radford NR, Hutton ML, Dickson DW: TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and alzheimer's disease. *Ann Neurol* 61: 435–445, 2007

Apostolou A, Shen Y, Liang Y, Luo J, Fang S: Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Exp Cell Res* 314: 2454–2467, 2008

Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 602–611, 2006

Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK: Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 30: 400–407, 2008

Ayala YM, De Conti L, Avendano-Vazquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, Tollervey J, Ule J, Baralle M, Buratti E, Baralle FE: TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J* 30: 277–288, 2011

Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, Romano M, Baralle FE: Human, drosophila, and C.elegans TDP43: Nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *J Mol Biol* 348: 575–588, 2005

Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, Buratti E, Baralle FE: Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci* 121: 3778–3785, 2008

- Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM: The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: An immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 229: 329–346, 1984
- Barmada SJ, Skibinski G, Korb E, Rao EJ, Wu JY, Finkbeiner S: Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 30: 639–649, 2010
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, ALS/ Riluzole Study group: A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 3: 585–591, 1994
- Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C: Requirements for Stress Granule Recruitment of Fused in Sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem* 287: 23079–23094, 2012
- Bergeron C, Beric-Maskarel K, Muntasser S, Weyer L, Somerville MJ, Percy ME: Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 221–230, 1994
- Bilican B, Serio A, Barmada SJ, Nishimura AL, Sullivan GJ, Carrasco M, Phatnani HP, Puddifoot CA, Story D, Fletcher J, Park IH, Friedman BA, Daley GQ, Wyllie DJ, Hardingham GE, Wilmut I, Finkbeiner S, Maniatis T, Shaw CE, Chandran S: Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5803–5808, 2012
- Bole DG, Hendershot LM, Kearney JF: Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol* 102: 1558–1566, 1986
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE: Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234: 723–748, 1973
- Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, Garnes J, Dang V, Lievers J, Shoukat-Mumtaz U, Martinez R, Gai H, Blake R, Vaisberg E, Grskovic M, Johnson C, Irion S, Bright J, Cooper B, Nguyen L, Griswold-Prenner I, Javaherian A: A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci* 56: 355–364, 2013
- Buratti E: Functional significance of TDP-43 mutations in disease. *Adv Genet* 91: 1–53, 2015
- Buratti E, Baralle FE: Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J Biol Chem* 276: 36337–36343, 2001
- Buratti E, Dork T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE: Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J* 20: 1774–1784, 2001

Caccamo A, Shaw DM, Guarino F, Messina A, Walker AW, Oddo S: Reduced protein turnover mediates functional deficits in transgenic mice expressing the 25 kDa C-terminal fragment of TDP-43. *Hum Mol Genet* 24: 4625–4635, 2015

Calfon M, Zeng H, Urano F, Hill JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D: IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the *XBP-1* mRNA. *Nature* 415: 92–95, 2002

Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH: Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* 16: 4069–4079, 1996

Collinge J, Sidle KC, FAU - Meads, J., Meads J, Ironside J, Hill AF: Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685–690, 1996

Colombrita C, Onesto E, Megiorni F, Pizzuti A, Baralle FE, Buratti E, Silani V, Ratti A: TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *J Biol Chem* 287: 15635–15647, 2012

Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, Silani V, Ratti A: TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem* 111: 1051–1061, 2009

De Marco G, Lomartire A, Mandili G, Lupino E, Buccinnà B, Ramondetti C, Moglia C, Novelli F, Piccinini M, Mostert M, Rinaudo MT, Chiò A, Calvo A: Reduced cellular Ca^{2+} availability enhances TDP-43 cleavage by apoptotic caspases. *Biochim Biophys Acta* 1843: 725–734, 2014

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R: Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72: 245–256, 2011

Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P 3rd, Good SK, Johnson BA, Herz J, Yu G: TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol Cell Biol* 31: 1098–1108, 2011

Dormann D, Capell A, Carlson AM, Shankaran SS, Rodde R, Neumann M, Kremmer E, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Haass C: Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J Neurochem* 110: 1082–1094, 2009

Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W: The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum Mol Genet* 21: 3703–3718, 2012

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD: Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185: 235–240, 2004

Freeman SH, Spires-Jones T, Hyman BT, Growdon JH, Frosch MP: TAR-DNA binding protein 43 in Pick disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 62–67, 2008

Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, Nukina N: A seeding reaction recapitulates intracellular formation of sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. *J Biol Chem* 286: 18664–18672, 2011

Garea-Rodríguez E, Eesmaa A, Lindholm P, Schlumbohm C, König J, Meller B, Kriegelstein K, Helms G, Saarma M, Fuchs E: Comparative analysis of the effects of neurotrophic factors CDNF and GDNF in nonhuman primate model of parkinson's disease. *PLoS One* 11: E0149776, 1–21, 2016

Guo W, Chen Y, Zhou X, Kar A, Ray P, Chen X, Rao EJ, Yang M, Ye H, Zhu L, Liu J, Xu M, Yang Y, Wang C, Zhang D, Bigio EH, Mesulam M, Shen Y, Xu Q, Fushimi K, Wu JY: An ALS-associated mutation affecting TDP-43 enhances protein aggregation, fibril formation and neurotoxicity. *Nat Struct Mol Biol* 18: 822–830, 2011

Haas IG, Wabl M: Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306: 387–389, 1983

Hackman P, Sarparanta J, Lehtinen S, Vihola A, Evilä A, Jonson PH, Luque H, Kere J, Screen M, Chinnery PF, Åhlberg G, Edström L, Udd B: Welander distal myopathy is caused by a mutation in the RNA-binding protein TIA-1. *Ann Neurol* 73: 500–509, 2013

Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64: 60–70, 2008

Harding HP, Zhang Y, Ron D: Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 398: 271–274, 1999

Harding PH, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D: An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11: 619–633, 2003

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K: Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10: 3787–3799, 1999

Hella E: Aivokammioon injisoidun CDNF:n vaikutuksen ja leviämisen karakterisointi hiirillä. Pro gradu -työ, Farmakologian ja lääkehoidon osasto, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto, 2014

Herdewyn S, Cirillo C, Van Den Bosch L, Robberecht W, Vanden Berghe P, Van Damme P: Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice. *Mol Neurodegener* 9: 1–24, 2014

Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, Kwak S: Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis* 45: 1121–1128, 2012

Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, Feldmeyer D, Sprengel R, Seeburg PH: Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406: 78–81, 2000

Honjo Y, Kaneko S, Ito H, Horibe T, Nagashima M, Nakamura M, Fujita K, Takahashi R, Kusaka H, Kawakami K: Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 12: 444–450, 2011

Huang C, Tong J, Bi F, Zhou H, Xia XG: Mutant TDP-43 in motor neurons promotes the onset and progression of ALS in rats. *J Clin Invest* 122: 107–118, 2012

Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, Clark CM, Elman LB, Miller BL, Grossman M, McCluskey LF, Trojanowski JQ, Lee VM: Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 173: 182–194, 2008

Igaz LM, Kwong LK, Chen-Plotkin A, Winton MJ, Unger TL, Xu Y, Neumann M, Trojanowski JQ, Lee VM: Expression of TDP-43 C-terminal fragments in vitro recapitulates pathological features of TDP-43 proteinopathies. *J Biol Chem* 284: 8516–8524, 2009

Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, Chen-Plotkin A, Swanson E, Unger T, Malunda J, Xu Y, Winton MJ, Trojanowski JQ, Lee VM: Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest* 121: 726–738, 2011

Ilieva EV, Ayala V, Jové M, Dalfó E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M: Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130: 3111–3123, 2007

- Izquierdo JM, Valcárcel J: Two isoforms of the T-cell intracellular antigen 1 (TIA-1) splicing factor display distinct splicing regulation activities. *J Biol Chem* 282: 19410–19417, 2007
- Janssens J, Wils H, Kleinberger G, Joris G, Cuijt I, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S: Overexpression of ALS-associated p.M337V human TDP-43 in mice worsens disease features compared to wild-type human TDP-43 mice. *Mol Neurobiol* 48: 22–35, 2013
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat P-F, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA: TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40: 572–574, 2008
- Kaplan A, Spiller KJ, Towne C, Kanning KC, Choe GT, Geber A, Akay T, Aebischer P, Henderson CE: Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. *Neuron* 81: 333–348, 2014
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S: Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427: 801, 2004
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P: RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147: 1431–1442, 1999
- Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vandenburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH: Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323: 1205–1208, 2009
- Li Q, Yokoshi M, Okada H, Kawahara Y: The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. *Nat Commun* 6: 1–12, 2015
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen V-M, Andressoo J-O, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M: Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448: 73–78, 2007
- Liu SJ, Zukin RS: Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci* 30: 126–134, 2007
- Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, Mehta T, Zaarur N, McKee A, Bowser R, Sherman M, Petrucelli L, Wolozin B: Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: Analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One* 5: E13250, 1–15, 2010.

Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretzschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM-Y, Trojanowski JQ: Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 61: 427–434, 2007

Mackenzie IR, Nicholson AM, Sarkar M, Messing J, Purice MD, Pottier C, Annu K, Baker M, Perkerson RB, Kurti A, Matchett BJ, Temirov J, Hsiung G-YR, Krieger C, Murray ME, Kato M, Fryer JD, Petrucelli L, Zinman L, Weintraub S, Mesulam M, Keith J, Zivkovic SA, Hirsch-Reinshagen V, Roos RP, Züchner S, Graff-Radford NR, Petersen RC, Caselli RJ, Wszolek ZK, Finger E, Lippa C, Lacomis D, Stewart H, Dickson DW, Kim HJ, Rogaeva E, Bigio E, Boylan KB, Taylor JP, Rademakers R: TIA-1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia promote phase separation and alter stress granule dynamics. *Neuron* 95: 808–816, 2017

Magrane J, Cortez C, Gan W-B, Manfredi G: Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum Mol Genet* 23: 1413–1424, 2014

Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EGP, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten J, Abramazon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pamphlett R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O, The Chromosome 9-ALS/FTD consortium, The French research network on FTL/FTLD/ALS, The ITALSGEN consortium, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu C-S, Yeh T-H, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ: Frequency of the *C9orf72* hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 11: 323–330, 2012

McCombe PA, Henderson RD: Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend Med* 7: 557–570, 2010

McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, Rouleau GA, Vande Velde C: TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum Mol Genet* 20: 1400–1410, 2011

Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G: Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3: 1–10, 2004

Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barrios JA, Leon-Chavez BA, Dueas Jimnez JM, Dueas Jimnez SH, Escobedo L, Martinez-Fong D. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. *J Neuroinflam* 11: 1–18, 2014

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130–133, 2006

Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Tsunoda Y, Suzuki N: Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43. *J Biol Chem* 285: 608–619, 2010

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M: Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4: 124–134, 2013

Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M: Phosphorylation of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) by truncated casein kinase 1 δ triggers mislocalization and accumulation of TDP-43. *J Biol Chem* 291: 5473–5483, 2016

Ou S-HI, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB: Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motif. *J Virol* 69: 3584–3596, 1995

Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. Toinen painos. Academic Press, San Diego, 1986

Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, Ling S-C, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW, Cleveland DW: Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 14: 459–468, 2011

Popovic D, Vucic D, Dikic I: Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nature Med* 20: 1242–1253, 2014

Rao ZR, Yamano M, Wanaka A, Tatehata T, Shioshaka S, Tohyama M: Distribution of cholinergic neurons and fibers in the hypothalamus of the rat using choline acetyltransferase as a marker. *Neuroscience* 20: 923–934, 1987

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita V-M, Kaivorinne A-L, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M,

The ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ: A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72: 257–268, 2011

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RB Jr: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59–62, 1993

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncel RW: Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326: 1464–1468, 1992

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW: Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38: 73–84, 1995

Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch MA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L, Rademakers R: Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 4: E1000193, 1–8, 2008

Sengul G, Watson C, Tanaka I, Paxinos G: Atlas of the spinal cord of the rat, mouse, marmoset, rhesus and human. *Ensimmäinen painos. Academic press*, 2013

Sephton CF, Good SK, Atkin S, Dewey CM, Mayer P 3rd, Herz J, Yu G: TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J Biol Chem* 285: 6826–6834, 2010

Serio A, Bilican B, Barmada SJ, Ando DM, Zhao C, Siller R, Burr K, Haghi G, Story D, Nishimura AL, Carrasco MA, Phatnani HP, Shum C, Wilmot I, Maniatis T, Shaw CE, Finkbeiner S, Chandran S: Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4697–4702, 2013

Shimonaka S, Nonaka T, Suzuki G, Hisanaga S, Hasegawa M: Templated aggregation of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) by seeding with TDP-43 peptide fibrils. *J Biol Chem* 291: 8896–8907, 2016

Smethurst P, Newcombe J, Troakes C, Simone R, Chen Y-R, Patani R, Sidle K: In vitro prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. *Neurobiol Dis* 96: 236–247, 2016

Spiller KJ, Cheung CJ, Restrepo CR, Kwong LK, Stieber AM, Trojanowski JQ, Lee V MY: Selective motor neuron resistance and recovery in a new inducible mouse model of TDP-43 proteinopathy. *J Neurosci* 36: 7707–7717, 2016

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319: 1668–1672, 2008

Strong MJ, Volkening K, Hammond R, Yang W, Strong W, Leystra-Lantz C, Shoesmith C: TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol Cell Neurosci* 35: 320–327, 2007

Suzuki H, Matsuoka M: TDP-43 toxicity is mediated by the unfolded protein response-unrelated induction of C/EBP homologous protein expression. *J Neurosci Res* 90: 641–647, 2012

Swinnen B, Robberecht W: The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10: 661–670, 2014

Tan C-F, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H: TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 113: 535–542, 2007

Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briesse M, Cereda M, Kayikci M, König J, Hortobágyi T, Nishimura AL, Župunski V, Patani R, Chandran S, Rot G, Zupan B, Shaw CE, Ule J: Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci* 14: 452–458, 2011

Tong J, Huang C, Bi F, Wu Q, Huang B, Liu X, Li F, Zhou H, Xia X-G: Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *EMBO J* 32: 1917–1926, 2013

Tong J, Huang C, Bi F, Wu Q, Huang B, Zhou H: XBP1 depletion precedes ubiquitin aggregation and golgi fragmentation in TDP-43 transgenic rats. *J Neurochem* 123: 406–416, 2012

U.S. Food and Drug Administration (Viitattu 1.6.2017). Saatavissa internetissä: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm557102.htm>

Vaccaro A, Patten SA, Aggad D, Julien C, Maios C, Kabashi E, Drapeau P, Parker JA: Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity *in vivo*. *Neurobiol Dis* 55: 64–75, 2013

Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, Clay D, Wood EM, Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Steinbart E, McCluskey L, Grossman M, Neumann M, Wu I-L, Yang W-S, Kalb R, Galasko DR, Montine TJ, Trojanowski

JQ, Lee VM, Schellenberg GD, Yu C-E: *TARDBP* mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol* 7: 409–416, 2008

Voutilainen MH, De Lorenzo F, Stepanova P, Bäck S, Yu L-Y, Lindholm P, Pörsti E, Saarma M, Männistö PT, Tuominen RK: Evidence for an additive neurorestorative effect of simultaneously administered CDNF and GDNF in hemiparkinsonian rats: implications for different mechanism of action. *eNeuro* 4: 1–14, 2017

Voutilainen MH, Bäck S, Peränen J, Lindholm P, Raasmaja A, Männistö PT, Saarma M, Tuominen RK: Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 288: 99–108, 2011

Walker AK, Soo KY, Sundaramoorthy V, Parakh S, Ma Y, Farg MA, Wallace RH, Crouch PJ, Turner BJ, Home MK, Atkin JD: ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation. *PLoS One* 8: E81170, 1–12, 2013

Walker AK, Spiller KJ, Ge G, Zheng A, Xu Y, Zhou M, Tripathy K, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM: Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43. *Acta Neuropathol* 130: 643–660, 2015

Wang X-Z, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi L-J, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D: Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* 16: 4273–4280, 1996

Wang H-Y, Wang I-F, Bose J, Shen C-K: Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics* 83: 130–139, 2004

Wang I-F, Wu L-S, Chang H-Y, Shen C-K : TDP-43, the signature protein of FTL-D, is a neuronal activity-responsive factor. *J Neurochem* 105: 797–806, 2008

Wang Z, Tollervey J, Briesse M, Turner D, Ule J: CLIP: Construction of cDNA libraries for high-throughput sequencing from RNAs cross-linked to proteins *in vivo*. *Methods* 48: 287–293, 2009

Wang DB, Dayton RD, Henning PP, Cain CD, Zhao LR, Schrott LM, Orchard EA, Knight DS, Klein RL: Expansive gene transfer in the rat CNS rapidly produces amyotrophic lateral sclerosis relevant sequelae when TDP-43 is overexpressed. *Mol Ther* 18: 2064–2074, 2010

Wang W, Li L, Lin W-L, Dickson DW, Petrucelli L, Zhang T, Wang X: The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum Mol Genet* 22: 4706–4719, 2013

Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak JL, Fujioka H, Liang J, Jiang S, Ma X, Jiang Z, Lummertz da Rocha E, Sheng M, Choi H, Lerou PH, Li H, Wang X: The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nature Med* 22: 869–878, 2016

Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH: TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18809–18814, 2009

Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S: TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3858–3863, 2010

Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, M-Y Lee V: Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem* 283: 13302–13309, 2008

Woerner AC, Frottin F, Hornburg D, Feng LR, Meissner F, Patra M, Tatzelt J, Mann M, Winklhofer KF, Hartl FU, Hipp MS: Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. *Science* 351: 173–176, 2016

Xu Y-F, Gendron TF, Zhang Y-J, Lin W-L, D'Alton S, Sheng H, Castanedes Casey M, Tong J, Knight J, Yu X, Rademakers R, Boylan K, Hutton M, McGowan E, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L: Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci* 30: 10851–10859, 2010

Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido TC, Kwak S: A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat Commun* 3: 1–13, 2012

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL: ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6, 1355–1364, 2000

Zhang Y-J, Xu Y-F, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, Lin W-L, Tong J, Castanedes-Casey M, Ash P, Gass J, Rangachari V, Buratti E, Baralle F, Golde TE, Dickson DW, Petrucelli L: Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7607–7612, 2009

Zhang Y-J, Xu Y-f, Dickey CA, Buratti E, Baralle F, Bailey R, Pickering-Brown S, Dickson D, Petrucelli L: Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci* 27: 10530–10534, 2007

Zhou H, Huang C, Chen H, Wang D, Landel CP, Xia PY, Bowser R, Liu YJ, Xia XG: Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genet* 6: E1000887, 1–13, 2010

Zhou H, Huang C, Yang M, Landel CP, Xia PY, Liu YJ, Xia XG: Developing tTA transgenic rats for inducible and reversible gene expression. *Int J Biol Sci* 5: 171–181, 2009

Liite 1

Vasta-aineet, vasta-aine paketit ja proteiinit	Valmistaja	Valmistusmaa	Muita tietoja
Anti-koliiniasetyylitransferaasi primaari vasta-aine, Anti-Choline Acetyltransferase Antibody	Millipore	Yhdysvallat	Erä: 2552343 Kataloginnumero: AB 144P
Anti-TIA-1 primaari vasta-aine, TIA-1 Antibody	Santa Cruz Biotechnology	Yhdysvallat	Erä: D1015 Kataloginnumero: C-20: sc-1751
Anti-hCDNF 0,2 mg/ ml primaari vasta-aine	Icosagen	Viro	-
Humaani rekombinantti CDNF	Biovian Oy	Suomi	
Vectastain ABC HRP kit	Vector Laboratories	Yhdysvallat	PK-4005
Vectastain ABC HRP kit	Vector Laboratories	Yhdysvallat	PK-4001
Lääkkeet ja muut yhdisteet			
Alukkeet	Oligomer Oy	Suomi	
Aqualox	VOCO	Saksa	
Buprenorfiini, Bupac multidoset 0,3 mg/ml	Richter Pharma AG	Itävalta	
Coverquick 2000	VWR Chemicals	Ranska	
Doksimysiini, Doximysin 20 mg/ml inj.	Orion Pharma	Suomi	
3,3-diaminobentsidiini, DAB Peroxidase (HRP) Substrate kit (with Nickel), 3,3'-diaminobenzidine	Vector Laboratories	Yhdysvallat	PK-4100
Etanolit	Altia Oyj	Suomi	
Isofluraani, Isofluran	Baxter Oy	Suomi	
Karprofeeni, Rimadyl vet 50 mg/ml	Zoetis	Belgia	
Klooriheksidiiniglukonaatti liuos 5 mg/ml, Klorhexol	Unimedica Ab	Ruotsi	
Lidokaiini ja adrenaliini, Lidocain 10 mg/ ml c. adrenalin injektioneste	Orion Pharma	Suomi	
Natriumkloridiliuos, Natriumklorid 9 mg/ ml	Braun		
Natriumsitraatti	Sigma-Aldrich		
Paraformaldehydi	Sigma-Aldrich		
Pentobarbitali, Mebunat vet 60 mg/ ml	Orion Pharma	Suomi	
PBS	Bioteekniikan instituutti, Elatus, HY	Suomi	
TBS	Bioteekniikan instituutti, Elatus, HY	Suomi	
Tween 20	Sigma-Aldrich		
Vetyperoksidi	Sigma-Aldrich		

